

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Elektrochemische Untersuchungen und Identifizierung von Oxidationsprodukten phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

Vorgelegt von

Dipl.-Chem. Sina Kummer

geb. am 20.11.1987 in Salzwedel

aus Rostock

Rostock, März 2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie der Universität Rostock in der Zeit von April 2013 bis März 2016 unter der Betreuung von Prof. Dr. Udo Kragl angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Udo Kragl

Universität Rostock, Institut für Chemie, Abteilung Analytische und Technische Chemie
Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Uwe Karst

Universität Münster, Institut für Anorganische und Analytische Chemie
Corrensstr. 30, 48149 Münster

Datum der Einreichung: 04.04.2016

Datum der Verteidigung: 28.06.2016

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Kragl für die Möglichkeit bedanken, dieses spannende Thema bearbeiten zu können. Darüber hinaus gilt mein Dank für die ausgezeichnete Betreuung, den fruchtbaren Diskussionsrunden und den gewährten Freiraum. Die einmalige Möglichkeit einen halbjährigen Auslandsaufenthalt in Texas ermöglicht zu bekommen, war für mich eine unbegrenzt dankbare Erfahrung. Das vielseitige Fachwissen von Prof. Bard in Austin ermöglichte mir den Blick über den Tellerrand in die weite Welt der Elektrochemie.

Die Arbeit wäre ohne die finanzielle Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt Dr. Ruth, der mit seinem umfangreichen Fachwissen auf dem Gebiet der Analytik und Elektrochemie immer eine große Hilfestellung gewesen war. Ich bedanke mich ebenfalls für die Unterstützung in den Experimenten bei der Kopplung von der Elektrochemie und der Massenspektrometrie und seine Geduld bei jeglichen Fragen.

Prof. Kühn danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den quantenchemischen Berechnungen. Danke für die Geduld, mir die theoretischen Aspekte zu erklären, die Tücken von Gaussian zu erläutern und mich bei der Auswertung der Daten zu unterstützen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie der persönlichen und fachlichen Hilfsbereitschaft danken, die mir meine Arbeit im Labor erleichtert hat.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für ihre Begleitung auf dem Weg zur Dissertation. Besonders meinen Eltern möchte ich für das Vertrauen und die Rücksicht danken, welche sie mir während dieser Zeit entgegengebracht haben. Nur der Rückhalt der Familie macht einen stark für die Überraschungen und Herausforderungen, die das Leben für einen bereithält.

Vielen Dank auch an meine Freunde für viele fröhliche Stunden und der willkommenen Abwechslung neben der Promotion.

Kurzzusammenfassung

Die elektrochemisch initiierte Oxidation und damit das elektroaktive Verhalten von Flavonoiden, die zu den Polyphenolen der sekundären Pflanzenstoffe gezählt werden, wurden detailliert untersucht. Dazu erfolgten quantenchemische Berechnungen der möglichen Flavonoidradikale zur Bestimmung der reaktiven Seiten am jeweiligen Molekül in der wässrigen Phase. Weiterhin erfolgte die Identifizierung der Oxidationsprodukte mittels der Kopplung der Massenspektrometrie mit einer elektrochemischen Durchflusszelle. Dabei konnten die gebildeten Produkte online im Massenspektrometer detektiert werden und die Oxidationsmechanismen der Flavonoide postuliert werden.

Die elektrochemisch initiierte Oxidation von 3-Methylcatechol, eine einfache phenolische Verbindung, wurde genutzt, um eine Laccase-initiierte oxidative C-N-Kopplung mit *n*-Hexylamin nachzuahmen. Durch die kombinierte Verwendung von elektrochemischer Durchflusszelle (EC) mit der Massenspektrometrie (ESI-MS) können Metabolismusreaktionen von Enzymen verstanden und aufgeklärt werden. Damit dient die Anwendung von EC/ESI-MS als ein ergänzendes oder sogar ersetzendes Werkzeug bei Metabolismusstudien von Enzymen und zeigt das hohe Potential der elektrochemischen Syntheseroute.

Abstract

The electrochemical initiated oxidation and therefore the electroactive behaviour of flavonoids, which belong to the polyophenolics of plant secondary metabolites, were investigated in detail. Quantum chemical calculations of possible flavonoid radicals were performed to determine the reactive sites of the molecule in water phase. The identification of the oxidation products was realised by the coupling of an electrochemical flow cell with mass spectrometry. The formed products were detected online with the mass spectrometer and the oxidation mechanisms of the flavonoids were postulated.

The electrochemical initiated oxidation of 3-methylcatechol, a simple phenolic compound, was used to mimic a laccase-initiated oxidative C-N coupling reaction with *n*-hexylamine. Due to the combined use of the electrochemical flow cell (EC) and mass spectrometry (ESI-MS), metabolic reactions of enzymes can be comprehended and explained. The application of EC/ESI-MS represents a suitable tool to support or even replace enzymatic metabolism studies and shows the high potential of the electrochemical synthesis route.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und Flavonoide.....	2
1.2 Elektrochemische Oxidation von Flavonolen	6
1.3 Quantenchemische Berechnungen zu möglichen Oxidationsprodukten von Flavonolen	7
1.4 Kopplung von Elektrochemie und Massenspektrometrie zur Bestimmung von Oxidationsprodukten sowie zur Nachahmung von Metabolismusreaktionen	9
2. Zielsetzung.....	11
3. Einordnung und Diskussion der eigenen Ergebnisse	13
3.1 Vergleich von elektrochemischer Oxidation der Flavonole mit berechneter Protonenaffinität und Elektronentransferenthalpie in Wasser	13
3.2 Oxidation der Flavonole in einer elektrochemischen Durchflusszelle direkt gekoppelt mit ESI-MS.....	16
3.3 Elektrochemisch initiierte C-N-Kopplung von 3-Methylcatechol und <i>n</i> -Hexylamin in einer Durchflusszelle verfolgt mit ESI-MS	19
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	25
5. Literatur	29
6. Publikationen.....	37
Publikation I	39
Publikation II.....	49
Publikation III	59
7. Anhang.....	69

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1-1: Hauptgruppen der Flavonoide.	4
Abb. 1-2: Strukturformel der Flavonole.....	5
Abb. 1-3: Zugrundegelegte Oxidationsmechanismen bei quantenchemischen Berechnungen mit den zugehörigen Enthalpien.....	8
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Kopplung von einer elektrochemischen Durchflusszelle mit der Massenspektrometrie.....	9
Abb. 2-1: Übersicht der verschiedenen Aspekte dieser Arbeit.	12
Abb. 3-1: DPVs der 1 mM Flavonole im Phosphat-Ethanol-Puffer bei einer Scanrate von 10 mV/s.	14
Abb. 3-2: Überblick des elektroaktiven Verhaltens der ausgewählten Flavonole während der Oxidation in Methanol mit 0.1% Ameisensäure.....	19
Abb. 3-3: Relative Intensitäten der elektrochemisch initiierten Kopplungsprodukte bei unterschiedlichen Substratverhältnissen.....	22
Tab. 1-1: Übersicht über in Deutschland erhältliche funktionelle Lebensmittel [2, 10]....	2
Tab. 3-1: Hierarchie der E_p^{ox} -, PA- und SPLET-Werte.	15

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE-Produkte	Produkte unter anderem angereichert mit Vitamin A, C und E
BDE	Bindungsdissoziationsenergie
C	Kohlenstoffatom
CV	Cyclovoltammetrie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPV	Differenzpulsvoltammetrie
E	Elektrodenpotential
e^-	Elektron
EC	elektrochemische Durchflusszelle
EC/ESI-MS	Kopplung von elektrochemische Durchflusszelle und Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisation
E_p^{ox}	Oxidationspotential
ESI-MS	Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisation
ETE	Elektronentransferenthalpie
H^+	Wasserstoffatomkation
H^\bullet	Wasserstoffatomradikal
HAT	H-Atom-Transfer (Wasserstoffatom-Transfer)
HOAc	Essigsäure
I	Stromstärke
IP	Ionisierungspotential
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Stickstoffatom
O	Sauerstoffatom
OCH_3	Methoxy
OH	Hydroxyl
PA	Protonenaffinität
PDE	Protendissoziationsenthalpie

RO ⁻	Flavonoidanion
RO [•]	Flavonoidradikal
ROH	Flavonoidmolekül
ROH ^{•+}	Flavonoidradikalkation
S	Schwefelatom
SET	Single-Elektron-Transfer
SPLET	sequentielle Protonenabgabe mit Elektronentransfer
Tab.	Tabelle
%	Prozent

1. Einleitung

In der heutigen Zeit sind die Anforderungen der Konsumenten an die Lebensmittel in der Nahrungsmittelindustrie deutlich verändert. Der Endverbraucher glaubt zunehmend an einen Zusammenhang von Lebensmittel und Gesundheit, um mit der Ernährung einen optimalen Gesundheitszustand zu erreichen und mögliche Risiken für Krankheiten zu reduzieren [1]. Dabei spielen funktionelle Lebensmittel (Functional Foods, Nahrungsmittel angereichert mit zusätzlichen Inhaltsstoffen) eine immer stärkere Rolle in der Ernährung, da diese mit einem positiven Effekt auf die Gesundheit beworben werden. Mit der gestiegenen Lebenserwartung und den höheren Kosten im Gesundheitswesen rücken ernährungsabhängige Erkrankungen als Todesursache immer weiter in den Vordergrund, da die Erkenntnisse zwischen der Ernährungsweise und der Entstehung sowie Vermeidung vieler Erkrankungen erweitert wurde [2-5].

Aufgrund des Fehlens einer gesetzlichen Definition von funktionellen Lebensmitteln in Europa positionieren sie sich in einer „grauen Zone“ zwischen Nahrungsmittel und Pharmazeutikum. Hauptsächlich treten die Definitionsprobleme bei Produkten mit der Verhinderung von nahrungsverbundenen Krankheiten und/oder der Unterstützung der Gesundheit auf [6]. Prinzipiell sind es Lebensmittel, die als Teil der Alltagskost verzehrt werden und nicht als Tabletten, Kapseln oder andere arzneitypische Darreichungsformen vorkommen. Aber sie sollen über ihre klassische ernährungsphysiologische Funktion hinaus einen Zusatznutzen aufweisen [2].

Ursprünglich stammt das Konzept der funktionellen Lebensmittel aus Japan, welches als einziges Land weltweit spezielle rechtliche Regelungen für diese Produktgruppe festlegt. Um Missbrauch und Verbrauchertäuschung zu vermeiden, müssen dort seit 1991 funktionelle Lebensmittel ein Zulassungsverfahren durchlaufen und dürfen dann mit Angaben zu gesundheitsbezogenen Funktionen beworben werden [2, 6, 7]. In Europa und Amerika gibt es lediglich eine allgemein anerkannte Begriffsbestimmung, wobei aber klar von einem Arzneimittel differenziert wird [7]. Die Europäische Union verfasste 2006 eine Verordnung mit einer Health-Claims-Liste für angebrachte Lebensmittelwerbung [8, 9]. Nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben unterliegen jetzt detaillierten Anforderungen, sodass ernährungsphysiologisch ungünstige Lebensmittel nicht mit einem positiven „Gesundheits-Image“ beworben werden dürfen. Doch Ehrlichkeit, das Ende von Irreführung und Täuschung, mehr Transparenz und Verbraucherschutz sind nur teilweise umgesetzt, da auch Produkte mit Vitamin- und Mineralstoffzusätze als gesund vermarktet werden dürfen („gut für das Immunsystem“), obwohl ein hoher Zucker- und/oder Fettgehalt in diesen Lebensmitteln vorliegt. Darüber hinaus wurden keine Höchstmengen für die Anreicherung mit Mikronährstoffen festgelegt; damit kann eine Überversorgung mit negativen Folgen für die Gesundheit eintreten. Die Lebensmittelindustrie benutzt Gesundheits-Slogans gezielt, um zusätzlich Kaufanreize zu schaffen.

In Deutschland lassen sich verschiedene funktionelle Lebensmittel in den unterschiedlichsten Bereichen finden. Eine Übersicht ist in Tab. 1-1 gezeigt [2, 10]. Dies

stellt keine erschöpfende Liste dar; sie soll lediglich einen Überblick über den breiten Markt geben.

Tab. 1-1: Übersicht über in Deutschland erhältliche funktionelle Lebensmittel [2, 10].

Produktgruppe	Beispiele
Pro- und Präbiotika	pro- und präbiotische Milchprodukte präbiotische Backwaren probiotische Fruchtgetränke und Molkenprodukte
ACE-Produkte	Getränke ACE-Fruchtsnack Tiefkühlgemüse
Omega-3-Produkte	Brot und andere Back- sowie Teigwaren mit Omega-3-Fettsäuren Brotbackmischungen mit Eicosapentaen- und Docosahexaensäure Eier mit Docosahexaensäure Margarine
Produkte mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen	Margarine mit Phytosterinen Riegel mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und ACE-Vitaminen phytoöstrogenhaltige Riegel Frucht-Gemüsesaft-Cocktails mit sekundären Pflanzeninhaltsstoffen Mineralwasser mit Antioxidantien Fruchtsaft mit Grüntee-Extrakt Süßwaren, Kaugummis
Mineralien	calciumangereicherte Fruchtsäfte Brot mit Calcium calciumangereichertes Müsli
Ballaststoffe	ballaststoffangereicherte Riegel ballaststoffangereichertes Müsli Joghurt und Milchdrinks Säfte

Aussagen über Wirkungen eines funktionellen Lebensmittels sind nur zulässig, wenn sie wissenschaftlich hinreichend gesichert sind, wobei strittig ist, was "hinreichend gesicherte wissenschaftliche Erkenntnisse" konkret bedeutet. Zu Beginn wurden viele epidemiologische Studien und Interventionsstudien durchgeführt, die lediglich mit Verzehrprotokollen oder Fragebögen erhoben worden waren. Mittlerweile werden zunehmend Stoffwechselvorgänge und Wirkungsmechanismen einbezogen. Nur wenige funktionelle Lebensmittel sind eingehend untersucht worden, beispielsweise Vitamin E, Vitamin C und β -Carotin. Wenige Untersuchungen wurden bisher an andere Antioxidantien gemacht wie Flavonoide, obwohl diese Substanzen möglicherweise eine größere biologische Wirksamkeit aufweisen [10].

1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und Flavonoide

Pflanzen synthetisieren eine breite Vielfalt an organischen Verbindungen, die in primäre und sekundäre Produkte des Zellstoffwechsels eingeteilt werden. Primäre Metaboliten sind Verbindungen, die eine essentielle Rolle in der Photosynthese, Atmung, Wachstum und Entwicklung spielen. Dies umfasst unter anderem Phytosterine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleotide, Aminosäuren und organische Säuren. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dagegen werden nicht unbedingt für Wachstums- und Entwicklungsprozesse benötigt [11]. Sie kommen in den einzelnen Pflanzen lediglich in geringen Mengen vor,

sind teilweise nur für bestimmte Pflanzen beziehungsweise Pflanzenarten charakteristisch, und dienen der Pflanze zum Beispiel als Abwehr-, Fraßschutz- und Farbstoffe sowie als Wachstumsregulatoren. Die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sollen somit pollenverbreitenden Insekten oder samenverteilende Tiere anlocken, vor UV-Strahlung schützen, mikrobielle Infektionen abhalten, als Verdunstungsschutz oder mechanische Festigung dienen. Da sie weit im Pflanzenbereich verteilt sind, aber nicht generell anzutreffen sind, wird die Zahl der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe auf über 100000 geschätzt, wobei bisher nur vergleichsweise wenige Pflanzen in dieser Hinsicht analysiert wurden [12].

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe können aufgrund ihres biosynthetischen Ursprungs in vier Hauptgruppen unterteilt werden [11]:

- Terpene,
- Flavonoide und verwandte phenolische und polyphenolische Verbindungen,
- stickstoffhaltige Alkaloide und
- schwefelhaltige Verbindungen.

Die Terpene, auch Isoprenoide genannt, stellen die umfangreichste Klasse der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe dar. Dabei werden über 30000 hauptsächlich pflanzlicher und seltener tierischer Herkunft umfassende Verbindungen gezählt, welche unter anderem Aromen und Düfte, Antibiotika, pflanzliche und tierische Hormone, Membranlipide, Insektenlockstoffe und Antifraßstoffe sind. Ihre Strukturen lassen sich auf Isopreneinheiten zurückführen. Die beiden jeweils fünf kohlenstoffhaltigen Bausteine Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat können enzymatisch durch ein oder mehrere Kondensationsprozesse unterschiedlich viele Kohlenstoffatome umfassende Moleküle bilden, die als Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene bezeichnet werden. Bekannte Vertreter sind Menthol, Geraniol, Retinol, Cholesterin oder β -Carotin [11, 12].

Bei den Alkaloiden handelt es sich um vorwiegend basische Naturstoffe aus der Pflanze mit heterocyclisch gebundenem Stickstoff. Sie leiten sich von Aminosäuren oder den Zwischenprodukten des Aminosäurestoffwechsels ab. Viele der etwa 12000 bekannten Alkaloide werden wegen des schützenden Verhaltens gegen Fraßfeinde und Krankheitserreger in der Pflanzenwelt in der heutigen Zeit als Arzneimittel, Aufputzmittel, Betäubungsmittel und als Gift genutzt. Sie werden ferner in weitere Untergruppen eingeteilt, wie die Benzylochinolin-Alkaloide, Tropan-Alkaloide, Tabak-Alkaloide, Terpenoid-Indol-Alkaloide, Purin-Alkaloide oder Pyrrolizidin-Alkaloide. Bekannte Vertreter sind das Atropin unter anderem vorkommend in der Schwarzen Tollkirsche, das Kokain des Kokastrauchs, Codein im Opium des Schlafmohns, Strychnin, Koffein, Nikotin, Morphin, das Steroidalkaloid Solanin in der Kartoffel, das Aglykon Tomatidin in Tomaten und das Lupinidin in Lupinensamen [11, 13].

Schwefelhaltige pflanzliche Verbindungen können entweder im Glukosinolat-Myrosinase-System von Kreuzblütlern wie Kohl, Brokkoli und Brunnenkresse oder im Alliin-Alliinase-System von Lauchpflanzen wie Knoblauch, Zwiebeln und Porree in der

Ernährung gefunden werden. Die Glucosinolate, selbst ungiftig, werden erst bei Gewebeverletzungen enzymatisch mittels der Myrosinase in toxische Isothiocyanate, Nitrile und Thiocyanate umgewandelt und bieten damit einen Fraßschutz vor Pflanzenfressern. Isothiocyanate sorgen so für den charakteristischen bitteren Geschmack von vielen Salatpflanzen. Auch das Alliin wird bei der Hydrolyse mittels der Alliinase entweder in Propanthial-S-oxide oder in Thiosulphinate umgeformt, die sich dann weiter spontan abbauen und so eine breite Ansammlung von flüchtigen organischen Schwefelverbindungen verursachen [11].

Phenolische Verbindungen in der Pflanze sind durch wenigstens einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen an diesem Ring charakterisiert. Über 8000 phenolische Strukturen sind bisher bekannt und variieren von einfachen niedermolekularen Verbindungen mit einem aromatischen Ring bis hin zu großen und komplexen Polyphenole wie die Tannine. Phenolische Verbindungen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Flavonoide und Nicht-Flavonoide, wobei nach ihrer Anzahl und der Verknüpfung der Kohlenstoffatome weiter klassifiziert werden kann. Zu den Nicht-Flavonoiden, die lediglich ein Drittel der Polyphenole ausmachen, werden Phenolsäuren, Stilbene und Lignane gezählt. Flavonoide hingegen gehören der größten und vielfältigsten Gruppe der Pflanzeninhaltsstoffe an [14]. Sie bestehen grundsätzlich aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring C, welches das Flavan-Grundgerüst darstellt. Die Flavonoide lassen sich anhand struktureller Unterschiede am Ring C und dem daraus unterschiedlich resultierenden Redoxstatus des Pyronringes in sechs Untergruppen einteilen: Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavanole, Anthocyanidine und Isoflavone. Eine Übersicht mit den jeweiligen Grundstrukturen ist in Abb. 1-1 dargestellt, wobei Hydroxylgruppen der Ringe A und B der Übersichtlichkeit nicht gezeigt sind.

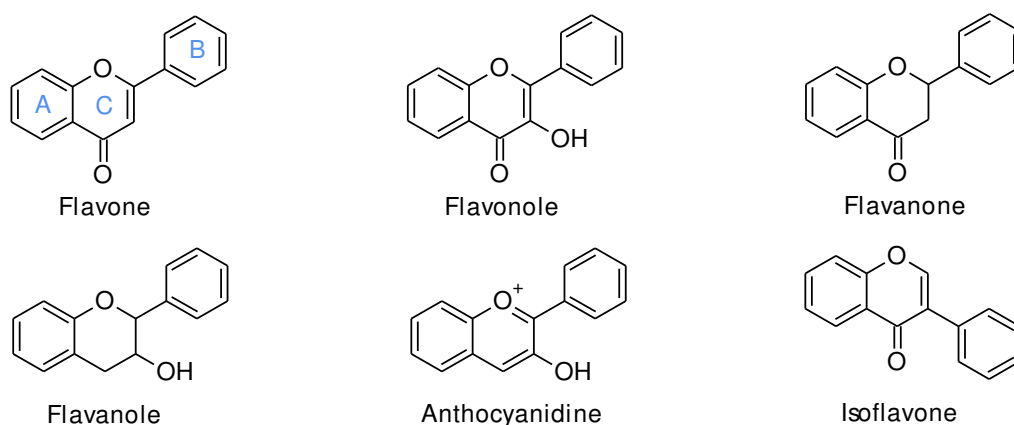


Abb. 1-1: Hauptgruppen der Flavonoide.

Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht frei vor, sondern sind besonders häufig mit Glykosiden verknüpft. Flavonole stellen eine Ausnahme dar; sie sind auch ohne Zuckerreste als Aglykone in der Natur anzutreffen. Durch die variable Anzahl und die Stellung der Hydroxylgruppen sowie die Stellung und Art der Verknüpfung von Zuckerresten an dem Flavonoidringgerüst ergibt sich eine große strukturelle Vielfalt, wobei bis zu 6500 Strukturen bekannt sind [15].

Flavonoide befinden sich immer als Gemische verschiedener Flavonoidarten überwiegend in den Randschichten der Pflanze wie in den äußeren Blättern oder als Farbstoffe in den Blüten oder Früchten. Dabei wird deren Konzentration stark von der Anbautechnik, der Sorte, den klimatischen Bedingungen und besonders von der jahreszeitlichen Lichtintensität beeinflusst [14, 15].

Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit liegt auf der Substanzklasse der Flavonole. Sie sind durch eine Hydroxylgruppe an der C₃-Position und durch eine C₂-C₃-Doppelbindung im Ring C charakterisiert. Unterschiedliche Anzahl und Stellung der Hydroxylgruppen am Ring B ergeben verschiedene Derivate. Eine Auflistung über die verwendeten Flavonole in dieser Arbeit ist in Abb. 1-2 gegeben. Die Flavonole stellen die wohl am weitesten verbreitete Substanzklasse der Flavonoide dar. Quercetin lässt sich unter anderem in Erdbeeren, Äpfel, Hopfen, Zwiebeln, Tabak, Rotwein [16], Kopfsalat [17], grünen Bohnen, grüner Paprika, Petersilie, Brokkoli und Orangen [18] finden. Myricetin ist zum Beispiel in Rotwein [16], schwarzen Johannisbeeren, Weintrauben [17], grünen Bohnen, Petersilie, Brokkoli, Spinat, Zwiebeln, Orangen und Kakis [18] enthalten. Isorhamnetin kommt in Birnen, Sanddornbeeren, Dillkraut und Fenchel (Blätter) [17] vor. Fisetin kann in Zwiebeln, Kiwis, Äpfel, Kakis, Grapefruits und vor allem in Erdbeeren [18] gefunden werden. Kaempferol lässt sich in Erdbeeren, Pfirsiche, Tabak, Tee, Hopfen, schwarze Johannisbeeren [16], Kopfsalat, Spinat, Sanddornbeeren, Weintrauben [17], grünen Bohnen, Kartoffeln, Tomaten, grüner Paprika, Karotten, Petersilie, Kohl, Brokkoli, Zwiebeln, Gurken, Kiwis, Wassermelonen, Äpfel und Grapefruits [18] nachweisen. Dies zeigt deutlich, dass Flavonole meist als Mischung mehrerer Flavonole in der Pflanze auftreten. Untersuchungen zeigten, dass in Deutschland (Bayern) etwa 54 mg pro Tag (Schwankungsbreite 7-202 mg) an Gesamtflavonoiden aufgenommen werden, wobei die Flavonole 12 mg pro Tag ausmachen [15].

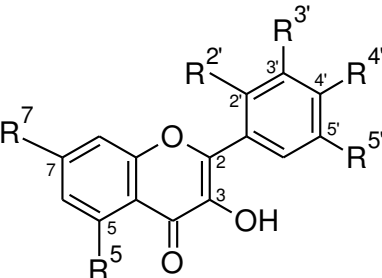
	Flavonol	R ⁵	R ⁷	R ^{2'}	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}
	Quercetin	OH	OH	H	OH	OH	H
	Myricetin	OH	OH	H	OH	OH	OH
	Isorhamnetin	OH	OH	H	OCH ₃	OH	H
	Fisetin	H	OH	H	OH	OH	H
	Morin	OH	OH	OH	H	OH	H
	Kaempferol	OH	OH	H	H	OH	H

Abb. 1-2: Strukturformel der Flavonole.

Die gesundheitsförderlichen Eigenschaften von Nahrungsmitteln gehen hauptsächlich auf die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe zurück [3], wobei die Flavonoide die wichtigsten biologischen Aktivitäten aufzeigen. Durch ihre antioxidativen Eigenschaften können reaktive Sauerstoffspezies (ROS, von „reactive oxygen species“) abgefangen werden, die in großem Umfang zu oxidativem Stress führen und in dessen Folge eine oxidative Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden möglich ist. Diesen oxidativen Schädigungen werden ursächliche Beziehungen zum Entstehen von chronischen Erkrankungen des Menschen wie Arteriosklerose, Krebs, Grauer Star und allgemeinen

Vorgängen des Alterns zugeschrieben [19]. Flavonoide haben aufgrund ihrer wirksamen antioxidativen Aktivitäten und ihrer Rolle in der Vorbeugung vor Krebs, kardiovaskuläre, neurodegenerative und infektiöse Krankheiten sowie Osteoporose und Diabetes [3] eine rege Aufmerksamkeit erhalten. Jedoch wurden bisher meist nur experimentelle Studien an Tieren oder kultivierten menschlichen Zelllinien durchgeführt und dies macht eine Vorhersage zu den Auswirkungen einer Polyphenolaufnahme zur Krankheitsprävention am Menschen schwierig [20]. Epidemiologische Studien zeigten zwar eine inverse Verbindung zwischen dem Risiko eines Herzinfarktes und dem Verzehr von Tee und Wein sowie der Aufnahme von einigen besonderen Flavonoiden, aber eine Verbindung zwischen Krebsrisiko und Polyphenolaufnahme wurde bisher nicht klar nachgewiesen. Dazu müssten zahlreichere Studien am Menschen durchgeführt werden, um einen deutlichen Beweis für gesundheits-schützende Effekte der Flavonoide darzulegen. Fraglich ist auch, welche Konzentration an Flavonoiden sinnvoll ist und welche Dosen zu hoch sind. Die Dosen der bisherigen Studien an Tieren oder Zelllinien lagen weitaus höher als die Konzentrationen von Flavonoiden in einer normalen Ernährung des Menschen [19, 20].

Dennoch ist aber mittlerweile nachgewiesen, dass die mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide teilweise im Darm absorbiert werden. Sie wurden im Blut und Urin nachgewiesen und könnten damit ihre antioxidative Wirkung im gesamten Körper entfalten. Aber nach der Metabolisierung im Darm werden die Aglycone der Flavonoide oder die methylierten Derivate mit Glucuronaten oder Sulfatgruppen in der Leber konjugiert. Auch Methylierungen sind möglich. Die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Flavonoide ändern sich dadurch. Konjugationen reduzieren damit effektiv die Anzahl der freien Hydroxylgruppen, die eine große Auswirkung auf die antioxidativen Eigenschaften haben, und können mögliche Interaktionen mit funktionell wichtigen Zellproteinen beeinflussen. Daher ist es interessant, die Auswirkungen dieser Konjugate oder Metaboliten auf relevante Gewebe, Zellen oder Proteine zu untersuchen, um mechanistische Einblicke in ihrer Rolle zur Vorbeugung von altersbedingten Erkrankungen und zur Erhaltung einer optimalen Gesundheit zu erlangen [11].

1.2 Elektrochemische Oxidation von Flavonolen

Der antioxidative Mechanismus von Flavonoiden beruht auf der Fähigkeit Elektronen abzugeben. Flavonoide besitzen ein kleineres Oxidationspotential als zum Beispiel die reaktiven Sauerstoffspezies, wodurch sie sich als Radikalfänger auszeichnen. Für die antioxidative Aktivität der Flavonoide spielen Anzahl und Stellung der freien Hydroxylgruppen eine größere Rolle als das jeweilige Grundgerüst der sechs Untergruppen allein. Zwar zeigen alle durchaus eine antioxidative Aktivität, doch Untersuchungen zu Strukturen von Flavonoiden bezüglich einer hohen antioxidativen Aktivität ergab folgende Kriterien [21]:

- eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 im Ring C,
 - eine Oxo-Funktion am Kohlenstoff 4 im Ring C und
 - eine zusätzliche Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 im Ring C.
-

Damit zeigen Flavonole die höchsten antioxidativen Aktivitäten. Diese Untergruppe der Flavonoide ist in der Lage, nach der Abgabe von einem Elektron sich selbst als entstandenes Radikal zu stabilisieren, da das einzelne ungepaarte Elektron über die Ringe B und C delokalisiert werden kann. Die antioxidative Aktivität wird noch durch eine *ortho*-Hydroxyfunktion am Ring B verstärkt [21, 22]. Die höchste Aktivität ist bei einer Pyrogallol-Einheit am Ring B von Flavonolen gegeben [22].

Mit Hilfe von elektrochemischen Messungen können physikochemische Parameter für die Antioxidantien bestimmt werden. Es lässt sich das Redoxpotential, die Anzahl der übertragenen Elektronen, die Geschwindigkeitskonstante der Elektrodenreaktion und vieles mehr mit voltametrischen Messungen angeben. Neben der Aussage über die Kinetik einer Reaktion sind häufig auch nach den Elektronentransferprozessen chemische Reaktionen vor- und nachgelagert. Zudem können sogar mit der Voltammetrie reaktive Zwischenstufen nachgewiesen werden und Reaktionsmechanismen aufgeklärt werden [23]. Die erhaltenen Redoxpotentiale von Flavonoiden aus elektrochemischen Messungen geben über die Aktivität als Radikalfänger insofern Auskunft, dass kleine Werte für sehr geeignete Radikalfänger stehen.

Allerdings können mögliche reaktive Seiten am Molekül und deren Radikalspezies mit der Elektrochemie nicht eindeutig bestimmt werden, sodass quantenchemische Berechnungen mit Gaussian als Hilfe bei der Aufklärung eines Reaktionsmechanismus der Flavonole dienen können.

1.3 Quantenchemische Berechnungen zu möglichen Oxidationsprodukten von Flavonolen

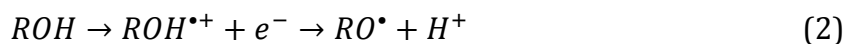
Zwei Hauptmechanismen sind bekannt, die die quantenchemische Berechnung von Oxidationen an Flavonoiden beschreiben:

- H-Atom-Transfer (HAT), wo die Bindungsdissoziationsenergie (BDE) eine wichtige Rolle spielt,
- Single-Elektron-Transfer (SET) mit dem Ionisierungspotential (IP) und der Protodissoziationsenthalpie (PDE) als Schlüsselparameter.

Bei dem H-Atom-Transfer wird nach der homolytischen Abspaltung eines Wasserstoffatoms an der Hydroxylgruppe am aromatischen Ring ein Radikal gebildet. Der HAT-Mechanismus ist in der Gleichung (1) dargestellt.

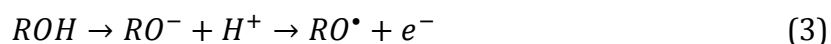


Der zweite Mechanismus beschreibt zuerst einen Ein-Elektronen-Transfer-Prozess, wobei das Molekül zum Radikalkation wird, um dann im zweiten Schritt ein Wasserstoffatom abzuspalten. Der SET-Mechanismus ist in der Gleichung (2) gezeigt.



Mittels BDE und IP kann die Effektivität von Antioxidantien bestimmt werden [24]. Je höher die Stabilität des Radikals ist, desto höher ist die Wirksamkeit des Antioxidans.

Dafür spricht einerseits die leichte Spaltung der OH-Bindung oder andererseits die leichte Abgabe eines Elektrons für die Bewertung zur Wirksamkeit eines Antioxidans [25]. Systematische theoretische Studien einiger phenolischer Antioxidantien in der Gasphase schlussfolgern, dass HAT der dominierende Mechanismus für ihr antioxidatives Verhalten darstellen [24-26]. Jedoch beziehen die wenigsten Studien die Lösungsumgebung mit in Betracht [25, 27-30]. Ein dritter Mechanismus, bisher nicht eingehend untersucht, ist in Wasserphase zu bevorzugen, da dort eine Ladungstrennung stattfinden kann. Dies geht einher mit einer sequentiellen Protonenabgabe gefolgt von einem Elektrontransfer (SPLET, sequential proton loss electron transfer). In einem ersten Schritt wird das Molekül zum Phenoxidanion deprotoniert, welcher von der Protonenaffinität (PA) gesteuert wird. Es folgt ein Elektrontransferschritt, um das Radikal zu bilden, das durch die Elektronentransferenthalpie (ETE) charakterisiert ist. Der SPLET-Mechanismus ist in Gleichung (3) gezeigt.



Eine schematische Darstellung der drei Mechanismen ist in der Abb. 1-3 verdeutlicht, die die Reaktionswege eines Moleküls mit den zugehörigen Enthalpien zusammenfasst.

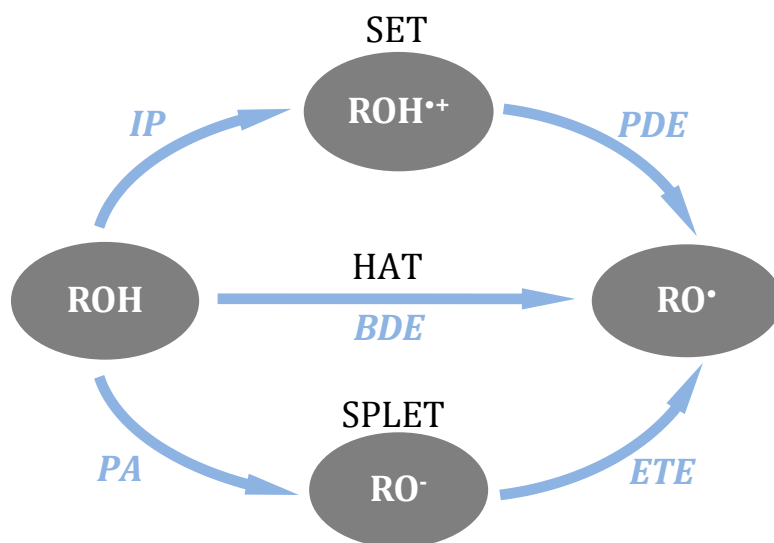


Abb. 1-3: Zugrundegelegte Oxidationsmechanismen bei quantenchemischen Berechnungen mit den zugehörigen Enthalpien.

Alle drei Mechanismen ergeben das gleiche Flavonoidradikal als Ergebnis, wobei der SET- und der SPLET-Mechanismus in polaren Medien aufgrund der Ladungstrennung zu bevorzugen sind. In der **Publikation I** [31] wurde der SPLET-Mechanismus angewendet, da pH-Wert-Messungen einen alkalischen Charakter gezeigt haben und von deprotonierten Molekülen in Lösung auszugehen ist. Dabei wurde die Deprotonierung aller möglichen OH-Gruppen der jeweiligen Flavonole mit umgebenen Wassermolekülen betrachtet, um mögliche reaktive Seiten und Radikalspezies zu identifizieren.

Verhalten vieler redoxaktiver Substanzen zu untersuchen, so auch Flavonoide. Diese haben kurzlebige Oxidationsprodukte und deren Intermediate vollziehen Folgereaktionen während ihrer aktivierten Zustände. Auf diese Weise ist es möglich, die postulierten Spezies aus den quantenchemischen Berechnungen zu verifizieren.

Während der elektrochemischen Oxidation in der Durchflusszelle können die Substanzen annähernd vollständig umgesetzt werden, wenn eine große Elektrodenoberfläche zur Verfügung steht und geringe Durchflussraten gewählt werden, um so hohe Umwandlungsraten zu erhalten. Dennoch müssen die oxidierten Spezies mit hohen Flussraten schnell zum Massenspektrometer transportiert werden, um die kurzlebigen Intermediate detektieren zu können und die Zahl der Signale im Massenspektrum minimal zu halten. Daher muss ein Kompromiss in den Flussraten gefunden werden für längere Verweilzeiten mit hohen Umsätzen, aber mit erhöhtem Auftreten von Folgeprodukten, und die limitierte Detektion dieser kurzlebigen Zwischenprodukte trotz der hohen Empfindlichkeit der MS. Obgleich erste Hinweise bezüglich der Stabilität der oxidierten Spezies als Funktion des Elektrodenpotentials erhalten werden können, ermöglicht die MS strukturelle Informationen und die Identifizierung von Reaktanten und deren reaktiven Zwischenprodukten.

Darüber hinaus können EC/ESI-MS-Experimente ein nützliches Werkzeug sein, um enzymatisch katalysierte Reaktionen besser verstehen zu können. Viele Oxidationsreaktionen von Biomolekülen werden durch Enzyme mit den verschiedensten Mechanismen umgesetzt. **Publikation III** [46] beschreibt eine elektrochemisch initiierte Oxidation einer einfachen phenolischen Verbindung, die gleichermaßen eine Kopplungsreaktion mit einem Amin als Folgereaktion impliziert wie zum Beispiel eine Laccase-initiierte C-N-Kopplung von 3-Methylcatechol und *n*-Hexylamin [47, 48]. Bei der elektrochemischen Nachahmung von Metabolismusreaktionen lassen sich viele weitere Systeme mit einem einfachem instrumentellen Aufwand und großer Zeitersparnis untersuchen. Dabei können extremere Reaktionsbedingungen gewählt werden als für Enzyme üblich und so alternative elektrochemische Syntheserouten gefunden und verstanden werden.

2. Zielsetzung

Lange Zeit war der Fokus der lebensmittel- und ernährungswissenschaftlichen Forschung auf die „klassischen“ Nährstoffe wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette sowie Vitamine und Mineralstoffe ausgerichtet, um die Grundbedürfnisse der Ernährung qualitativ und quantitativ zu definieren und mögliche physiologische Mangelercheinungen zu vermeiden. Erst mit der Entdeckung der Bedeutung von Ballaststoffen in den 1970er Jahren [49] änderte sich die Ansicht, dass auch weitere Inhaltsstoffe von Lebensmitteln zur Gesundheit beitragen, diese aber bei Abwesenheit nicht zu Mangelercheinungen oder gar Tod führen. Inzwischen sind neben den Ballaststoffen zahlreiche weitere Lebensmittelinhaltsstoffe wie die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in den Vordergrund gerückt, die bei regelmäßiger Aufnahme einen gesundheitlichen Nutzen beinhalten. Das Wirkungsspektrum der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ist wie zuvor schon beschrieben sehr vielfältig und beruht meist auf den antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole. Belege dieser Wirkungen sind nur aus *in vitro* Versuchen und Tierexperimenten sowie epidemiologische Studien bekannt; Daten aus Interventionsstudien mit kausalem Nachweis liegen kaum vor.

Die Wirkungsweise beziehungsweise die effektive Wirkung der Flavonoide ist bislang nur im Ansatz erforscht. Klar ist, dass diese Substanzen bei der Bekämpfung von Krankheiten helfen. Nur die genauen Umstände und deren Mechanismen sind oft nicht eindeutig geklärt. Zudem ist es bei vielen Stoffen fraglich, in welchem Umfang die Wirkungen während einer normalen Ernährung oder gar durch die Gabe der Stoffe in isolierter Form erreicht werden können. Weiterhin muss geklärt werden, ob diese Substanzen ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften als Einzelsubstanz oder nur in komplexen Mischungen in ihrer Summe die ihnen zugeschriebenen positiven Effekte entfalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, das antioxidative Verhalten von ausgewählten Flavonolen zu charakterisieren. Dabei werden Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Fisetin, Morin und Kaempferol näher betrachtet. Voltammetrische Messungen sollen einen Aufschluss über ihre Redoxaktivität geben. Bisher wurden durch andere Arbeitsgruppen einzelne Vertreter aus verschiedenen Flavonoid-Untergruppen ausgewählt und miteinander verglichen. Dabei wurden in den publizierten Arbeiten jedoch immer unterschiedliche Lösungsmittelsysteme getestet und ein Vergleich untereinander ist damit nur schwer möglich. In dieser Arbeit soll eine umfassende Bewertung der Gruppe der Flavonole erfolgen und es wird erstmalig eine zusammenhängende Betrachtung im gleichen Lösungsmittelsystem geben. Daran soll sich eine Reihenfolge feststellen lassen, welches Flavonol mit einer bestimmten strukturellen Voraussetzung die höchste Redoxaktivität aufweist.

Anschließend steht die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Flavonole im Vordergrund. Dies soll einerseits durch quantenchemische Berechnungen erfolgen, um mögliche reaktive Seiten am Molekül und gebildete Radikalspezies vorherzusagen, und

andererseits durch die Kopplung mit der Massenspektrometrie erfolgen, um gebildete Produkte zu identifizieren.

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit soll die Etablierung der Kopplung von Elektrochemie und Massenspektrometrie zur elektrochemischen Nachahmung von Metabolismusreaktionen darstellen. Enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen können durch EC/ESI-MS-Experimente verstanden werden und liefern so einen Beitrag zur Aufklärung der Reaktionsmechanismen. Dazu soll die elektrochemisch initiierte Oxidation einer einfachen phenolischen Verbindung dienen, die dann im aktivierten Zustand eine Heterokopplung mit einem Amin (Michael-Addition) eingeht.

Eine Übersicht der verschiedenen Aspekte dieser Arbeit ist in der Abb. 2-1 dargestellt.



Abb. 2-1: Übersicht der verschiedenen Aspekte dieser Arbeit.

Die elektrochemische Oxidation der jeweiligen Substanzen soll zuerst in einer Batch-Zelle charakterisiert werden. Bei der Kopplung mit der Massenspektrometrie muss die Durchflusszelle charakterisiert werden, um bestmögliche Oxidationsbedingungen für die jeweiligen Substanzen gewährleisten zu können. Abschließend müssen optimale Kopplungsbedingungen für das Massenspektrometer gefunden werden.

3. Einordnung und Diskussion der eigenen Ergebnisse

Die einzelnen Publikationen für die kumulative Arbeit werden nachfolgend zusammengefasst, wobei jeweils der Überblick über den Stand der Technik gegeben wird und sich daraus die Motivation der Publikation ergibt. Zudem werden die wichtigsten Aspekte der Veröffentlichungen herausgestellt und kritisch bewertet.

3.1 Vergleich von elektrochemischer Oxidation der Flavonole mit berechneter Protonenaffinität und Elektronentransferenthalpie in Wasser

Das chemische Verhalten von Flavonoiden als Antioxidantien, beruhend auf der Fähigkeit Elektronen leicht abzugeben und damit als Radikalfänger dienend, wurde bereits in vielen experimentellen Studien thematisiert. Entweder wurden explizit Einzelsubstanzen einer Flavonoidklasse intensiv untersucht, zum Beispiel die der Untergruppe der Flavonolaglykone [50-58], oder wichtige beziehungsweise vielversprechende Kandidaten aus allen Untergruppen der Flavonoide ausgewählt und miteinander verglichen [21, 59-64]. Diverse experimentelle Methoden mit unterschiedlichsten Lösungsmittelsystemen führen aber dazu, dass die publizierten Ergebnisse nur schwer miteinander vergleichbar sind, um die Effektivität der Antioxidantien zu beurteilen und damit eine Hierarchie ihrer Wirksamkeit aufzustellen. Bekannt ist, dass bestimmte strukturelle Voraussetzungen nötig sind, um eine hohe Wirksamkeit zu besitzen: neben der Oxo-Funktion am Kohlenstoffatom 4 eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 im Ring C [21]. Damit zeichnen sich vor allem die Flavonole als sehr geeignete Untergruppe für hohes antioxidatives Verhalten aus. In der **Publikation I** [31] wurden sechs verschiedene Flavonole ausgewählt und deren effektive Wirksamkeit miteinander verglichen. Daher können nun erstmalig umfassend Substanzen einer einzelnen Untergruppe der Flavonoide unter gleichen Reaktionsbedingungen in eine Hierarchie bezüglich ihrer Wirksamkeit klassifiziert werden. Kleine Unterschiede in der Molekülstruktur, also verschiedene Anzahl und Stellung der Hydroxylgruppen an den aromatischen Ringen, verursachen ungleiche Redoxaktivitäten.

Aufgrund der Fähigkeit Elektronen leicht abgeben zu können, lassen sich Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Fisetin, Morin und Kaempferol mit elektrochemischen Methoden untersuchen. Mittels Cyclovoltammetrie (CV) und Differenzpulsvoltammetrie (DPV) sind die Oxidationspotentiale (E_p^{ox}) bestimmbar. Je kleiner der Wert des Oxidationspotentials ist, desto leichter kann das Flavonol Elektronen abgeben und zeigt somit eine höhere Wirksamkeit in der antioxidativen Eigenschaft. Alle sechs Flavonole wurden in einer wässrigen Phosphatpufferlösung mit 60% Ethanolanteil und etwa einem pH-Wert von 8.2-8.3 vermessen. Ethanol diente als Lösungsvermittler, da sich die Flavonole ungenügend in Wasser lösen. Ein festgesetzter pH-Wert mit definierter Leitfähigkeit ist zum Einen für eine ausreichende Elektronen-/Ionenwanderung bei

elektrochemischen Messungen wichtig und zum Anderen zeigen die Flavonole unterschiedliche pH-Abhängigkeiten bezüglich der Oxidationspotentiale in voltametrischen Messungen [50, 52, 53, 55, 56, 58, 61].

Aus den voltametrischen Messungen lassen sich einige Schlüsse ziehen. Das kleinste Oxidationspotential tritt auf, wenn drei Hydroxylgruppen in direkter Nachbarschaft am Ring B (Pyrogallol-Einheit) lokalisiert sind. Dies ist bei Myricetin gegeben (siehe Strukturformel in Abb. 1-2, S.5). Es zeigt den kleinsten Wert unter den getesteten Flavonolen. Quercetin mit einer Catechol-Einheit (zwei Hydroxylgruppen in direkter Nachbarschaft am Ring B) zeigt das zweite kleinste Oxidationspotential. Isorhamnetin mit einer Methoxy-Gruppe in Nachbarschaft zu einer Hydroxylgruppe am Ring B besitzt das dritte kleinste Oxidationspotential. Offensichtlich kann eine Methoxy-Gruppe das gebildete Radikal nicht im gleichen Maße stabilisieren wie eine zweite Hydroxylgruppe. Fisetin besitzt im Gegensatz zu Quercetin nur eine Hydroxylgruppe weniger am Ring A, was die Radikalstabilität so sehr beeinflusst, dass das Oxidationspotential von Fisetin zu höheren Werten verschoben ist. Eine einfache Hydroxylierung des Ringes B wie in Kaempferol führt genauso wie zwei Hydroxylgruppen in *meta*-Stellung am Ring B wie bei Morin zu ähnlich hohen Oxidationspotentialen. Diese beiden Flavonole besitzen annähernd gleiche Werte und sind unter den gemessenen Substanzen die schlechtesten Antioxidantien. Eine Übersicht über die Lage der Oxidationspotentiale aus den DPV-Messungen ist in der Abb. 3-1 gezeigt. Sie können in drei Gruppen eingeteilt werden: Myricetin ist ein sehr gutes Antioxidans, Quercetin, Isorhamnetin und Fisetin sind gute Antioxidanten und Morin sowie Kaempferol sind annehmbare Radikalfänger.

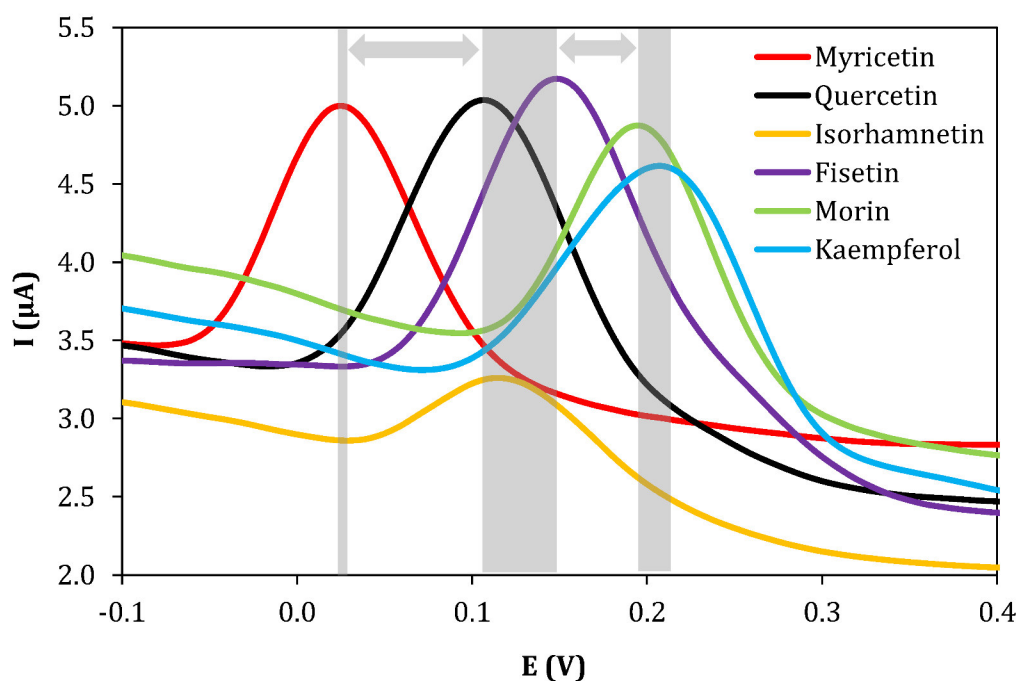


Abb. 3-1: DPVs der 1 mM Flavonole im Phosphat-Ethanol-Puffer bei einer Scanrate von 10 mV/s.

Um die unterschiedlichen Redoxaktivitäten verstehen zu können, ist es von großer Bedeutung, die Oxidationsmechanismen aufzuklären. Dabei können quantenchemische Berechnungen helfen. Die Literatur beschreibt für die erste oxidierte Seite am Molekül das Kohlenstoffatom 4' am Ring B für Quercetin, Myricetin und Fisetin [28, 29] sowie das Kohlenstoffatom 3 am Ring C für Morin und Kaempferol [29, 65]. Bei Quercetin gibt eine Veröffentlichung sogar beide mögliche Oxidationsseiten in einer wässrigen Phase im gleichem Maße an [27]. Durch unterschiedliche Berechnungsmethoden sind die absoluten Werte aber nicht miteinander vergleichbar, um daraus auch eine Hierarchie ableiten zu können. Ferner wurde Isorhamnetin in wässriger Phase bisher nicht betrachtet. Daher wurden eigene quantenchemische Berechnungen angefertigt, die eine Korrelation der absoluten Werte untereinander zulassen. Von den drei möglichen Oxidationsmechanismen (siehe Abb. 1-3, S. 8) wurde sich für den SPLET-Mechanismus entschieden, da die Flavonole in wässriger Lösung mit basischem Charakter deprotoniert vorliegen. Die berechneten Protonenaffinitäten sind in der Tab. 3-1 zusammengestellt, wobei nur die energetisch am niedrigsten aufzuwendende Protonabspaltung einer Molekülseite für jedes entsprechende Flavonol gezeigt ist.

Tab. 3-1: Hierarchie der E_{p}^{ox} -, PA- und SPLET-Werte.

E_{p}^{ox}	PA	SPLET (Anion)	SPLET (Minimum)
1	1 (4'-OH: 51.0)	1 (4'-OH: 98.9)	1 (4'-OH: 98.9)
2	4 (4'-OH: 51.1)	4 (4'-OH: 100.4)	4 (4'-OH: 100.4)
3	6 (4'-OH: 51.4)	3 (4'-OH: 102.4)	3 (3-OH: 101.6)
4	5 (2'-OH: 54.3)	2 (4'-OH: 103.3)	2 (3-OH: 101.9)
5	2 (4'-OH: 54.7)	6 (4'-OH: 103.3)	6 (3-OH: 102.2)
6	3 (4'-OH: 54.7)	5 (2'-OH: 107.2)	5 (3-OH: 102.3)

Alle Werte sind in kcal/mol angegeben.

1 Myricetin, 2 Quercetin, 3 Isorhamnetin, 4 Fisetin, 5 Morin, 6 Kaempferol

Gemäß den quantenchemischen Berechnungen erfolgt die Deprotonierung der ausgewählten Flavonole stets an den OH-Gruppen am C_{4'}-Atom. Bei Morin besitzt zwar die OH-Gruppe am C_{2'}-Atom den niedrigsten Wert, doch die OH-Gruppe am C_{4'}-Atom liegt mit 54.4 kcal/mol im gleichen Energieniveau, sodass eine exakte Differenzierung nicht möglich ist. Berechnungen von Deprotonierungsenergien bei Alvarez-Diduk und Kollegen ergaben auch eine Deprotonierung der OH-Gruppe am C_{4'}-Atom für Quercetin und Myricetin sowie die OH-Gruppe am C_{2'}-Atom für Morin. Jedoch geben sie für Kaempferol die OH-Gruppe am C₇-Atom an [30]. Amic und Kollegen errechneten Protonenaffinitäten für eine Deprotonierung an der OH-Gruppe am C₇-Atom für Quercetin, Myricetin, Fisetin und Kaempferol. Außer bei Morin konnte zwischen der Position 2' und 3 nicht unterschieden werden [29]. Dies zeigt deutlich, dass verschiedene Modelle an quantenchemische Berechnungen unterschiedliche Ergebnisse hervorbringen können und nur schwer miteinander vergleichbar sind.

Im zweiten Schritt der durchgeführten quantenchemischen Berechnungen wurden die Elektronentransferenthalpien betrachtet. Die Summe der Enthalpien aus der Protonenaffinität und dem Elektronentransfer ergeben den Gesamt-SPLET-Wert. Die Werte des SPLET-Mechanismus ausgehend von der bereits deprotonierten Seite sind in der Tab. 3-1 angeführt. Sie sind nach ihrer Größe sortiert, um eine Hierarchie bezüglich

des antioxidativen Verhaltens festlegen zu können. Findet eine Elektronabgabe an der bereits deprotonierten Seite des Moleküls statt, so zeigt Myricetin die kleinsten Reaktionsenthalpien. Daher geben sowohl die durchgeführten voltammetrischen Messungen als auch die berechneten Enthalpien Myricetin als bestes Antioxidans unter den sechs gewählten Flavonolen übereinstimmend an. Fisetin wird in den quantenchemischen Berechnungen als ein deutlich besseres Antioxidans hervorgehoben. Quercetin und Kaempferol haben nach den SPLET-Werten zufolge eine gleiche antioxidative Wirksamkeit. Morin ist theoretisch betrachtet deutlich der schlechteste Radikalfänger unter den gewählten Flavonolen. Eine bessere Übereinstimmung mit der Reihenfolge der Flavonole aus den voltammetrischen Experimenten lassen sich mit den quantenchemischen Berechnungen von Amic und Kollegen finden, bei denen Myricetin die kleinsten Werte besitzt, gefolgt von Quercetin und Fisetin. Kaempferol und Morin besitzen beide ähnlich große Enthalpien [29]. Hier kann die Einteilung der Flavonole in den drei Gruppen bezüglich ihrer antioxidativen Wirkung untermauert werden.

Zusätzlich ist der ausschließlich energetisch günstigste Fall für den SPLET-Mechanismus aller möglichen oxidierbaren Molekülstellen ergänzend in Tab. 3-1 angegeben. Diese Betrachtungsweise charakterisiert im annähernd neutralen wässrigen Milieu die labilste Seite im Molekül. Myricetin und Quercetin zeigen daher eine mögliche Oxidation an der Catechol-Einheit am Ring B. Alle anderen Flavonole werden laut theoretischer Betrachtung an der OH-Gruppe am C₃-Atom am Ring C oxidiert. Dies haben außer für Fisetin auch Amic und Mitarbeiter in ihrer Publikation veröffentlicht [65].

Allerdings betrachten die gezeigten quantenchemischen Berechnungen alle lediglich den ersten Proton-Elektron-Transferschritt, um die Reaktionsstelle am Molekül zu bestimmen. Die reaktiven Radikale gehen aber Folgereaktionen oder Umlagerungen ein, um stabile Zustände zu erreichen. Quantenchemische Berechnungen stoßen da an ihre Grenzen. Aus experimentellen Daten können meist 2-Elektronen-2-Protonen-Schritte für die Flavonole angegeben werden. Die Kopplung der Elektrochemie mit der Massenspektrometrie ermöglicht zum Teil eine Identifizierung sowie eine Aufklärung der Reaktionsmechanismen der gebildeten Produkte aus den reaktiven Radikalen.

3.2 Oxidation der Flavonole in einer elektrochemischen Durchflusszelle direkt gekoppelt mit ESI-MS

Im schnell wachsenden Forschungsfeld der Antioxidantien sind neue Methoden und Instrumente von großer Bedeutung, um ein einfaches und schnelles Screening von einzelnen Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften zu ermöglichen. Die bisher genutzten chemischen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität können in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden: die auf dem Wasserstoffatomtransfer (HAT) beruhenden Assays und die auf einfachen Elektrontransfer (SET) beruhenden Assays. In HAT-Assays konkurrieren das Antioxidans und das Substrat um die thermisch generierten Peroxyl-Radikale durch die Zersetzung von Azoverbindungen. Diese Untersuchungsmethode beinhaltet die

Hemmung der Autooxidation von Lipoproteinen, ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical trapping antioxidant parameter) und die Entfärbung von Crocin. ET-basierte Assays messen die Kapazität eines Antioxidans in Bezug zur Reduktion eines Oxidationsmittels, welches die Farbe während der Reduktion ändert. Der Grad des Farbwechsels korreliert mit der Probenkonzentration des Antioxidans. Dies beinhaltet FCR (total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent), TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity), FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), Kupfer(II)-Komplexe als Oxidationsmittel und DPPH [66].

Die chemischen Assays sind aber auf die Bestimmung der Gesamtkapazität beschränkt und können nicht die jeweilige Kapazität von einzelnen Substanzen in einer komplexen Probe angeben. Zettersten und Kollegen konnten mit ihren Arbeiten zeigen, dass sowohl die antioxidative Aktivität (die Leichtigkeit der Oxidation) als auch die Oxidationskapazität (Leistungsfähigkeit) einzelner Substanzen in komplexen Proben gleichzeitig bestimmt werden kann. Dies erreichten sie durch die vorherige Auftrennung der komplexen Probe mit Hilfe der Flüssigchromatografie, an die dann die elektrochemische Zelle und das Massenspektrometer angeschlossen waren. Jedoch gaben sie keine expliziten Reaktionsprodukte oder gar Reaktionsmechanismen für Catechin, Kaempferol, Resveratrol, Quercetin und Quercetinglykoside an [67]. Daher lag das Augenmerk der **Publikation II** [45] auf der Aufklärung der Reaktionsprodukte und deren Reaktionsmechanismen von Flavonolen mit der Hilfe einer elektrochemischen Durchflusszelle gekoppelt mit der Massenspektrometrie.

Die elektrochemische Oxidation der Flavonole in einer Durchflusszelle erfordert eine Charakterisierung dieser bezüglich hoher Umsätze in einem hydrodynamischen System. Wird eine große Elektrodenoberfläche für die Arbeitselektrode und eine langsame Flussrate gewählt, können kleine Substratkonzentrationen durch lange Verweilzeiten in der Durchflusszelle annähernd vollständig umgesetzt werden. Längere Verweilzeiten bedeuten aber, dass kurzlebige reaktive Zwischenprodukte Folgereaktionen eingehen. Daher muss ein Kompromiss gefunden werden zwischen annähernd vollständigem Umsatz und schnellen Flussraten für die Detektion der metastabilen reaktiven Zwischenprodukte. Zusätzlich muss die nachlassende Effektivität der Ionisation der Substanzen für die Detektion im Massenspektrometer bei schnellen hydrodynamischen Experimenten bedacht werden. Daher wurden während der Oxidation der Flavonole in der Durchflusszelle langsame Flussraten von 2 bis 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt. Trotzdem kann ein erster Anhaltspunkt zur Stabilität der Oxidationsprodukte als Funktion des Elektrodenpotentials durch die Kopplung von EC/ESI-MS erhalten werden.

Erste Voruntersuchungen in einem Wasser-Methanol-Gemisch mit Quercetin ergaben nach Anlegen eines konstanten Elektrodenpotentials viele Oxidationsprodukte, wobei nicht alle identifiziert werden konnten. Methanol musste als Lösungsvermittler zugegeben werden, um die Flavonole vollständig lösen zu können. Es zeigte sich, dass die methanol-addierten Oxidationsprodukte die größten Intensitäten im Massenspektrum besaßen. Nachfolgende Experimente fanden deswegen nur noch in Methanol ohne Wasseranteil statt, um die Anzahl der Oxidationsprodukte so gering wie möglich zu halten. Eine Oxidation von Quercetin unter einem konstanten

Elektrodenpotential von bis zu 0.6 V ergibt lediglich zwei Oxidationsprodukte mit m/z 331 und 363 bei negativer Ionisation. Erst deutlich ab 1.0 V können vier weitere Produkte detektiert werden: m/z 299, 329, 361 und 393. Anhand des erhaltenden Massenvoltammogramms kann ein Oxidationsmechanismus für Quercetin aufgestellt werden. Im ersten Schritt wird das Molekül durch einen 2-Elektronen-2-Protonen-Schritt zum *ortho*-Chinon oxidiert [52, 53, 60]. Dieses metastabile Intermediat unterläuft Umwandlungsreaktionen (m/z 299) oder Additionsreaktionen mit Nukleophilen (Michael-Addition) [51]. Daher kann als zweiter Schritt die einfache Methanol-Addition dem Signal m/z 331 und die zweifache Methanol-Addition dem Signal m/z 363 zugeordnet werden. Bei hohen angelegten konstanten Elektrodenpotentialen findet ein weiterer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidationsschritt der gebildeten stabilen Methanolprodukte statt (m/z 329 und 361). Diese stabilen 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidationsprodukte des Quercetins wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Sogar eine dritte Methanol-Addition kann detektiert werden (m/z 393). Diese Ergebnisse bestätigen einerseits das frühe Oxidationspotential von Quercetin als sehr geeigneten Radikalfänger und andererseits die hohe effektive Wirkung des Flavonols durch seine erneute Fähigkeit noch weitere Elektronen abgeben zu können.

Durch EC/ESI-MS-Experimente können weitere Flavonole über ihre effektive Wirkung als Radikalfänger beurteilt werden. Darüber hinaus lässt sich zeigen, dass strukturelle Voraussetzungen nötig sind, um antioxidatives Verhalten zeigen zu können. Sowohl durch das Fehlen der OH-Gruppe am Ring C wie bei Chrysin als auch die Abwesenheit von weiteren OH-Gruppen am Grundgerüst wie bei Flavonol offenbart, dass diese beiden Substanzen keine Eigenschaften als Radikalfänger unter den getesteten Bedingungen in diesem Potentialbereich aufzeigen. Die beiden OH-Gruppen am C₅- und C₇-Atom im Ring A werden hier nicht oxidiert. Dies zeigten bereits andere Veröffentlichungen auf, in denen die Oxidation dieser beiden OH-Gruppen bei weitaus höherem Potential erst möglich war [53, 58, 60, 68]. Kaempferol zeigt aufgrund der einfachen Hydroxlierung am Ring B ein deutliches antioxidatives Verhalten. Nach einer 2-Elektronen-2-Protonen-Abgabe konnte eine zweifache Methoxylierung detektiert werden. Morin zeigt eine ähnliche antioxidative Wirksamkeit wie Kaempferol auf. Die beiden OH-Gruppen am Ring B stehen in einer *meta*-Stellung zueinander, sodass das elektroaktive Verhalten aber geringer gegenüber Quercetin ausfällt. Myricetin besitzt durch seine Pyrogallol-Einheit am Ring B die größte Redoxaktivität unter den getesteten Substanzen. Es bildet nach einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation ebenfalls wie Quercetin eine Chinon-Einheit am Ring B und weist zwei Methoxylierungen auf. Nach einer weiteren 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation konnten Endprodukte mit bis zu vier Methanol-Additionen detektiert werden. Die 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidationen von Quercetin und Myricetin mit den dazugehörigen Oxidationsmechanismen wurden erstmalig in der **Publikation II** veröffentlicht.

Zusätzlich konnte eine Reihenfolge der multiplen Methoxylierungen angegeben werden. Die erste Methanol-Addition findet am C₂-Atom am Ring C statt, gefolgt am C₃-Atom am Ring C für die zweite Methanol-Addition [69]. Der dritte nukleophile Angriff erfolgt am C₄-Atom am Ring C und der vierte am C₂-Atom am Ring B. Es konnte klar gezeigt

werden, dass die Anzahl der Methanol-Additionen mit der Redoxaktivität zusammenhängt (Abb. 3-2). Zudem bietet die Kopplung von elektrochemischer Durchflusszelle mit der Massenspektrometrie eine neue Möglichkeit zur gleichzeitigen Bestimmung der antioxidativen Aktivität (die Leichtigkeit der Oxidation) und der Oxidationskapazität (Leistungsfähigkeit) einzelner Substanzen, was mit den in **Publikation II** dargestellten Ergebnissen eindeutig gezeigt werden konnte.

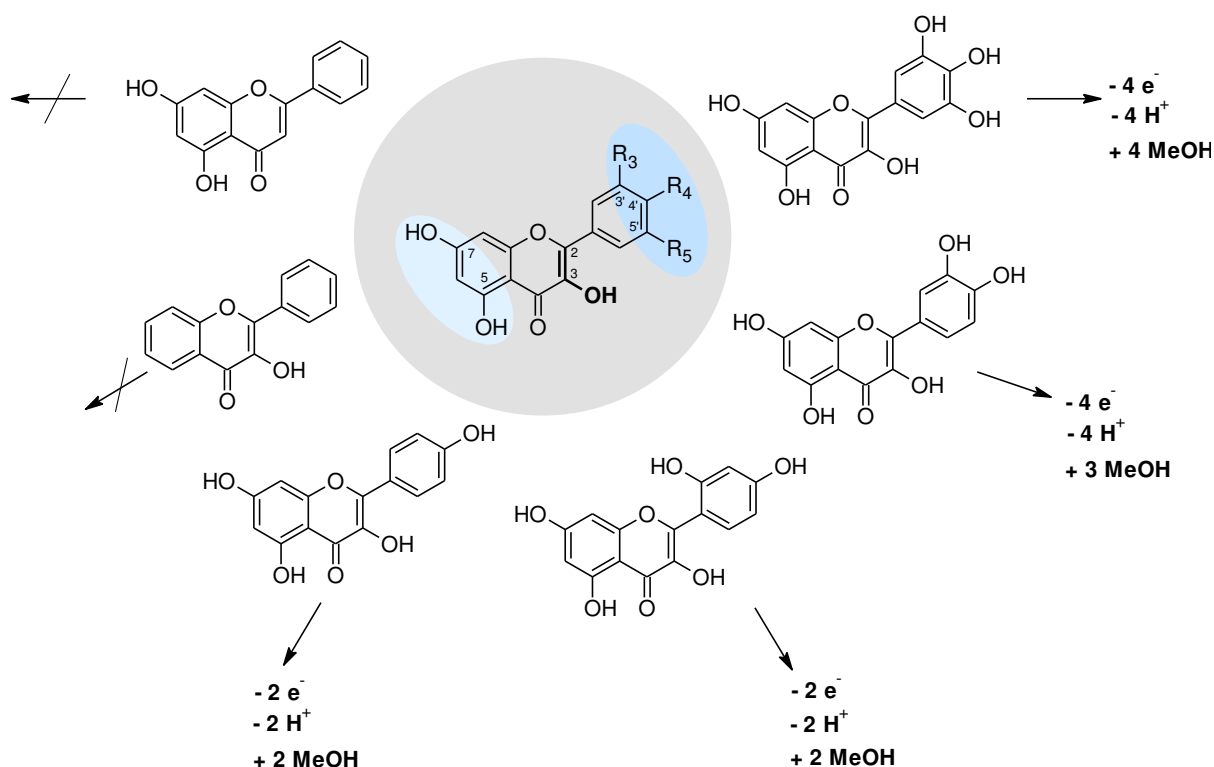


Abb. 3-2: Überblick des elektroaktiven Verhaltens der ausgewählten Flavonole während der Oxidation in Methanol mit 0.1% Ameisensäure.

3.3 Elektrochemisch initiierte C-N-Kopplung von 3-Methylcatechol und *n*-Hexylamin in einer Durchflusszelle verfolgt mit ESI-MS

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung der Kopplung von Elektrochemie und Massenspektrometrie zur elektrochemischen Nachahmung von Metabolismusreaktionen. Da viele Oxidationsreaktionen enzymatisch und mit diversen Mechanismen ablaufen, bietet EC/ESI-MS eine neue Möglichkeit die Redoxreaktionen von Biomolekülen zu verstehen und teilweise aufzuklären. Durch die Nachahmung der Stoffwechselreaktionen von Enzymen können Reaktionsprodukte und deren kurzlebige Intermediate sowie deren Struktur verifiziert werden.

Für dieses Ziel eignen sich die Enzyme der Oxidoreduktasen, in die zum Beispiel die Laccase (EC 1.10.3.2) eingeordnet ist. Laccasen sind kupferhaltige Polyphenoloxidasen [70, 71], die die Oxidation von phenolischen Hydroxylgruppen zu Phenoxyradikalen

vollziehen. Sie abstrahieren die Wasserstoffatome, um molekularen Sauerstoff als Elektronakzeptor zu Wasser umzusetzen. Die gebildeten, meist instabilen Radikale können eine Vielzahl an Reaktionen eingehen. Daher ist eine zweite enzymkatalysierte Oxidation des Radikals möglich oder es kann nichtenzymatische Reaktionen eingehen, wie Hydratation, Disproportionierung, Kopplungsreaktionen sowie Polymerisationsreaktionen [70, 72, 73]. Laccasen besitzen ein breites Substratspektrum, welches unter anderem Monophenole, *ortho*- und *para*-Diphenole, Methoxyphenole, Aminophenole, Polyphenole, Aniline und ligninähnliche Moleküle beinhaltet [70, 72]. Sie finden in vielen Bereichen eine Anwendung; so zum Beispiel in der Zellstoff- und Papierindustrie zur Ligninentfernung, in der Textil- und Färbemittelindustrie als Entfärbemittel, in der Nahrungsmittelindustrie als Stabilisierung und zur Qualitätsverbesserung von Getränken, in der Abwasserbehandlung von phenolischen Verbindungen sowie in der Kosmetikindustrie in Haarfärbemitteln [74-76]. In der organischen Synthese können diese Enzyme auch zur Herstellung von Feinchemikalien verwendet werden. Durch die hohe Stabilität in Lösungen, dem breitem Substratspektrum mit der spezifischen Selektivität für phenolische Strukturen und den milden Reaktionsbedingungen sind die Biokatalysatoren in der sogenannten „Grünen Chemie“ eine umweltfreundliche Alternative geworden [72-74].

Eine mittlerweile Standardanwendung in der Verwendung von Laccasen in der organischen Chemie ist die Oxidation von phenolischen Substraten zu Chinonintermediaten, die Folgereaktionen mit Nukleophilen eingehen (Michael-Addition), um stabile Produkte zu bilden. Das Nukleophil kann dabei ein Amin, ein Thiol, ein Alkohol oder ein Dien sein. Somit konnten C-N, C-S, C-O und C-C Bindungsknüpfungen erzielt werden [74].

Die heteromolekulare C-N-Kopplung von einem *ortho*-hydroxylierten Phenol steht in **Publikation III** [46] im Vordergrund. Die Laccase-initiierte oxidative Kopplung von 3-Methylcatechol mit *n*-Hexylamin ist in der Literatur bekannt [47, 48] und soll als Testreaktion bei der Nachahmung von Metabolismusreaktionen von Enzymen durch die Anwendung von EC/ESI-MS dienen. Ein großer Nachteil der enzymgesteuerten Kopplungsreaktion ist die Inaktivierung der Laccase bei hohen Methanolkonzentrationen im Lösungsmittelsystem [47, 48, 77-79]. Methanol ist aber als Lösungsvermittler äußerst bedeutungsvoll, da die verwendeten Substrate sowie das gebildete Kopplungsprodukt eine begrenzte Löslichkeit im wässrigen Milieu besitzen. Dies spielt vor allem in höheren Konzentrationsbereichen für den Scale-Up eine entscheidende Rolle. Der große Vorteil der elektrochemisch initiierten Oxidation ist die Unabhängigkeit des Lösungsmittels, da bei diesen Experimenten auf den Wasserzusatz verzichtet werden kann, der bei enzymgesteuerten Reaktionen für die beständige Aktivität der Laccase vorhanden sein muss. Methanol als einziges Lösungsmittel im Reaktionsprozess bewältigt die Löslichkeitsprobleme der Substrate und Produkte.

Da die elektrochemische Oxidation gleichermaßen eine milde Syntheseroute darstellt und die Oxidation von Catechol in der Literatur bekannt ist [80, 81], stellt die C-N-Kopplung von 3-Methylcatechol mit einem primären Amin mit Hilfe der Elektrochemie eine alternative Synthese zu den bekannten Methoden [82] dar. Darüber hinaus bietet

die direkte Identifikation der gebildeten Produkte mit dem Massenspektrometer einen entscheidenden zeitlichen Vorteil gegenüber enzymkatalysierten Prozessen, in denen eine (vollständige) Umsetzung der Substrate einerseits Stunden oder gar Tage dauern kann und es andererseits meist für die Analyse eine vorherige Aufarbeitung der Reaktionslösung bedarf. Bei EC/ESI-MS-Experimenten können die Resultate innerhalb von wenigen Minuten erhalten werden. Ziel der **Publikation III** war es, EC/ESI-MS als ergänzendes Werkzeug bei Metabolismusstudien zu etablieren und das hohe Potential der elektrochemischen Syntheseroute darzulegen.

Zu Beginn wurde die Oxidation von 3-Methylcatechol (Substrat 1) in der Durchflusszelle charakterisiert und der Oxidationsmechanismus aufgeklärt. Es zeigte sich, dass bei fehlendem Nukleophil (Substrat 2) in der Reaktionslösung das elektrochemisch gebildete Semichinon-Zwischenprodukt über eine Dimerisierung mit einem zweiten ein stabiles Produkt bildet. Das Dimer kann erneut über einen 2-Elektronen-2-Protonen-Schritt oxidiert werden, bei dem anschließend eine zweifache Methanol-Addition erfolgte. Befindet sich *n*-Hexylamin (Substrat 2) in der Reaktionslösung, erfolgt eine 2-Elektron-2-Proton-Oxidation von 3-Methylcatechol mit anschließender C-N-Kopplung. Dieses Kopplungsprodukt kann erneut über einen 2-Elektronen-2-Protonenschritt zum gewünschten Produkt oxidiert werden, sodass der Gesamtprozess eine 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidation mit C-N-Kopplung umfasst.

Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung der C-N-Kopplungsreaktion bezüglich sauren und basischen Reaktionsbedingungen in Methanol. Wenn auch Messungen von pH-Werten nur für wässrige Systeme definiert sind, kann mit pKs-Werten eine Acidität des Methanols grob abgeschätzt werden, da sich Methanol wie ein wasserähnliches Lösungsmittel verhält und ebenfalls autoprotolysieren kann. Die Zugabe von Essigsäure (pKs=4.76) zu Methanol ergibt ein saures Milieu. Basische Bedingungen können erhalten werden, wenn keine Essigsäure zugegeben wird, da *n*-Hexylamin stark basisch ist (pKs=10.56).

Bei 0.1% Essigsäureanteil in Methanol konnte das Produkt der C-N-Kopplungsreaktion nur als Nebenprodukt erhalten werden. Hauptsächlich konnte das zweifach methylierte Dimer im negativen Ionisationsmodus im Massenspektrum detektiert werden. Im positiven Ionisationsmodus wurde ausschließlich das Kopplungsprodukt mit einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidationsreaktion gefunden. Unter basischen Bedingungen lief die oxidative Kopplungsreaktion ohne Anlegen einer Spannung bereits eigenständig ab, was auf den in der Reaktionslösung gelösten Luftsauerstoff zurückzuführen ist. Zusätzlich konnten viele weitere nicht näher identifizierte Nebenprodukte im Massenspektrum beobachtet werden. Da eine Arbeitsweise unter Ausschluss des Luftsauerstoffs aufgrund der Gegebenheiten der technischen Anlagen nicht möglich ist, wurde ein leicht saures Milieu (0.01% Essigsäure) eingestellt. Im negativen Ionisationsmodus wurde das gewünschte Kopplungsprodukt zu 29% bei 1.2 V erhalten. Im positiven Ionisationsmodus wurde sowohl das Kopplungsprodukt mit einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidationsreaktion zu 7% als auch mit einer 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidationsreaktion zu 8% bei 1.2 V detektiert.

Um die Ausbeute des gewünschten Produkts zu erhöhen, ist ein Überschuss des Amins notwendig, was andere Arbeitsgruppen bei enzymkatalysierten Umsetzungen erfolgreich zeigen konnten [47, 83, 84]. Das Verhältnis von 1 mM 3-Methylcatechol zu 2 mM *n*-Hexylamin ergab eine deutlich erhöhte Ausbeute des gewünschten Kopplungsprodukts mit einer 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidation (93% im negativen und 31% im positiven Ionisationsmodus). Abb. 3-3 zeigt die relative Darstellung der Ausbeuten der beiden möglichen Produkte bei unterschiedlichen Substratverhältnissen. Ein umgekehrtes Substratverhältnis (2:1) führt zu geringeren Ausbeuten und zur bevorzugten Bildung des oxidierten Catechol-Dimers.

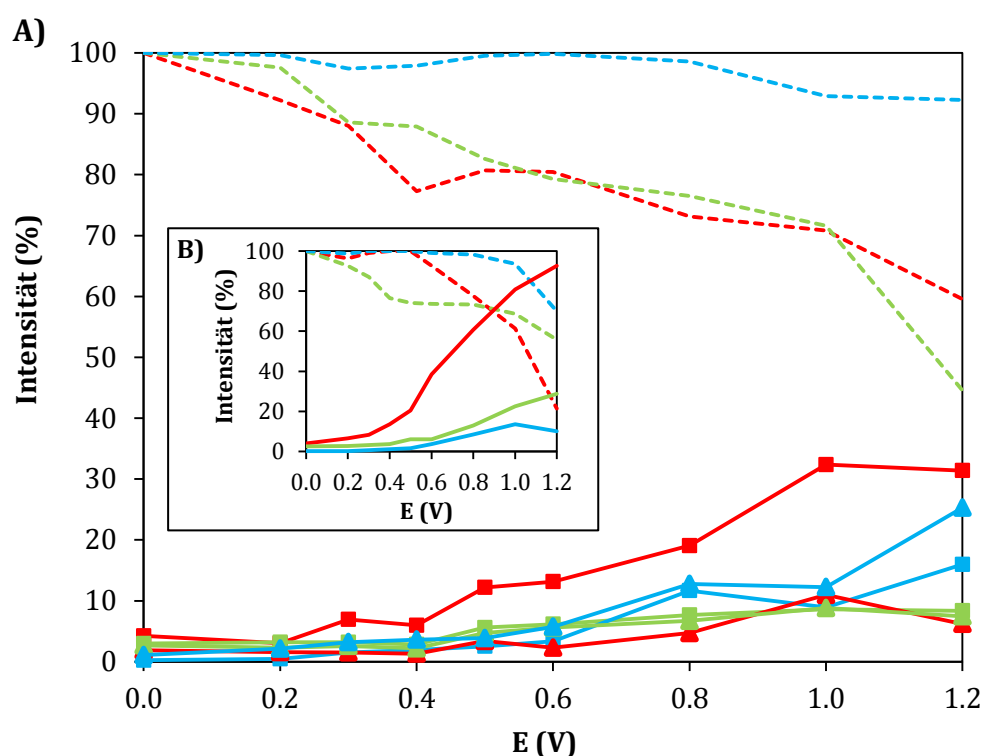


Abb. 3-3: Relative Intensitäten der elektrochemisch initiierten Kopplungsprodukte bei unterschiedlichen Substratverhältnissen. A) Intensität für *n*-Hexylamin (gestrichelt) und der Produkte *m/z* 222 (Quadrat) sowie *m/z* 224 (Dreiecke) in 0.01% HOAc/MeOH in Abhängigkeit vom angelegten Potential für Substratverhältnisse von 1:2 (rot), 1:1 (grün) und 2:1 (blau) im positiven Ionisationsmodus. B) Intensität für 3-Methylcatechol (gestrichelt) und des Produkts *m/z* 220 (durchgezogene Linie) im negativen Ionisationsmodus.

Bei Synthesen mit höheren Konzentrationen musste ein Zwei-Schritt-Verfahren angewendet werden, da das Massenspektrometer nur für den analytischen Messbereich ausgelegt ist. Der Einfluss von hohen Substratkonzentrationen auf die Kopplungsreaktion konnte damit abgeschätzt werden. Dazu wurde die zehnfach beziehungsweise fünfzigfach höher konzentrierte Produktlösung nach der Durchflusszelle gesammelt und im zweiten Schritt mit der Massenspektrometrie nach entsprechender Verdünnung gemessen. Diese hohen Konzentrationen konnten nicht vollständig in der Durchflusszelle umgesetzt werden. Eine Lösung mit 10 mM 3-Methylcatechol und 20 mM *n*-Hexylamin brachte einen Umsatz von 30% im negativen

und 7% im positiven Ionisationsmodus bei 0.8 V für das gewünschte Kopplungsprodukt mit einer 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidation. Bei 50 mM 3-Methylcatechol und 100 mM *n*-Hexylamin konnte ein Umsatz von 21% im negativen beziehungsweise 6% im positiven Ionisationsmodus erreicht werden. Es zeigte sich, dass die Bildung des Nebenprodukts mit einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation bei hohen Substratkonzentrationen unterdrückt werden konnte, aber eine zweifache Aminierung an das 3-Methylcatechol auftrat.

Die ersten Scale-Up-Experimente zeigen, dass die genutzte Durchflusszelle nur bedingt bei höheren Konzentrationen genutzt werden kann. Eine Verringerung der Durchflussrate von 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ergab eine Erhöhung der theoretischen Verweilzeit von 5.6 s auf 16.9 s für die Substrate in der Durchflusszelle. Der Umsatz für das gewünschte Kopplungsprodukt konnte bei negativem Ionisationsmodus auf 28% gesteigert werden, aber im positiven Ionisationsmodus ließ sich keine signifikante Änderung feststellen. Vollständige Umsätze der Substrate bei sehr hohen Konzentrationen kann daher ausgeschlossen werden, da längere Verweilzeiten aufgrund der verwendeten Spritzenpumpe mit noch langsameren Flussraten nicht einstellbar sind. Für zukünftige Experimente sollte entweder eine präparative Durchflusszelle oder eine gesonderte Elektrolysezelle verwendet werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sowohl die elektrochemisch initiierte als auch die enzymkatalysierte C-N-Kopplungsreaktion in einem größeren Konzentrationsmaßstab ihre Vor- und Nachteile besitzen. Vollständige Umsätze sind in der Durchflusszelle nicht möglich gewesen. Bei elektrochemischen Reaktionsführungen können entstandene Beläge auf den Elektrodenoberflächen durch Polieren beseitigt werden. Enzymkatalysierte Reaktionen benötigen bei hohen Substratkonzentrationen auch dementsprechend hohe Enzymmengen, was sich durchaus auf die Produktionskosten eines Prozesses widerspiegeln kann. Substratinhibierungen sind denkbar. Eine Aufarbeitung der Produktlösung gestaltet sich bei großen enzymatischen Ansätzen aufwendig. Zudem wurden bei Illner und Kollegen viele hochmolekulare Nebenprodukte unter der enzymatischen Reaktionsführung gebildet [48]. Bei der elektrochemisch initiierten Kopplungsreaktion ist lediglich das diaminierte Produkt entstanden. Dennoch muss bedacht werden, dass unter elektrochemischen Bedingungen die Oxidation an allen möglichen labilen Stellen des Substrats stattfinden kann, während enzymkatalysierte Reaktionen durch die spezifischen Substrat-Protein-Wechselwirkungen beeinflusst und gesteuert werden.

Weitere Anwendungen von elektrochemisch initiierten Kopplungsreaktionen wie die Kopplungsreaktion von *para*-Hydrochinonen mit aromatischen Aminen [83] oder sogar die Kopplung von Aryl- und Alkylthiole zur Bildung von C-S-Bindungen [85] sind vorstellbar.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnten die Oxidationsprodukte von Polyphenolen und die einer einfachen phenolischen Verbindung identifiziert werden und deren Reaktionsmechanismen aufgeklärt werden.

In Publikation I wurde das antioxidative Verhalten von ausgewählten Flavonolen durch voltammetrische Messungen charakterisiert. Es wurden Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Fisetin, Morin und Kaempferol näher betrachtet und erstmalig einer zusammenhängenden Betrachtung im gleichen Lösungsmittelsystem unterzogen. Daran ließ sich eine Hierarchie bezüglich ihrer Wirksamkeit aufstellen. Dabei konnten sie in drei Gruppen eingeteilt werden: Myricetin ist ein sehr gutes Antioxidans, Quercetin, Isorhamnetin und Fisetin sind gute Antioxidantien und Morin sowie Kaempferol sind annehmbare Radikalfänger. Die unterschiedlichen Redoxaktivitäten konnten durch die teilweise bekannten Oxidationsmechanismen aus der Literatur erläutert werden. Quantenchemische Berechnungen konnten nur anteilig dazu beitragen, da diese lediglich den ersten Proton-Elektron-Transferschritt angeben, um die Reaktionsstelle am Molekül zu bestimmen. Die reaktiven Radikale gehen aber Folgereaktionen oder Umlagerungen ein, um stabile Zustände zu erreichen. Quantenchemische Berechnungen stießen da an ihre Grenzen. Aus experimentellen Daten konnten meist 2-Elektronen-2-Protonen-Schritte für die Flavonole angegeben werden.

In Publikation II konnte durch die Kopplung der Elektrochemie mit der Massenspektrometrie eine Identifizierung sowie eine Aufklärung der Reaktionsmechanismen der gebildeten Produkte aus den reaktiven Radikalen erfolgen. Es war möglich die antioxidative Aktivität (die Leichtigkeit der Oxidation) und die Oxidationskapazität (Leistungsfähigkeit) der Flavonole gleichzeitig zu bestimmen, da die Anzahl der Methanol-Additionen mit der Redoxaktivität zusammenhing. Zudem ließ sich beweisen, dass strukturelle Voraussetzungen nötig sind, um antioxidatives Verhalten zeigen zu können. Die beiden Grundkörper Chrysin und Flavonol zeigten aufgrund der Abwesenheit zusätzlicher Hydroxylgruppen am Ring B keine Eigenschaften als Radikalfänger unter den getesteten Bedingungen. Kaempferol und Morin wiesen ein deutliches antioxidatives Verhalten auf, welches mit einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation mit einer zweifachen Methanol-Addition aber geringer gegenüber Quercetin ausfiel. Quercetin und Myricetin bildeten nach der ersten 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation erneut eine Catechol-Einheit am Ring B durch Umlagerungen aus, die wiederum einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation unterlag. Quercetin widerfuhr einer dreifachen Methanol-Addition, wogegen Myricetin als bestes Antioxidans der getesteten Substanzen eine vierfache Methanol-Addition vollzog. Eine 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidation von Quercetin und Myricetin wurden erstmalig in der Publikation II veröffentlicht.

In Publikation III konnte die Kopplung von Elektrochemie und Massenspektrometrie zur elektrochemischen Nachahmung von Metabolismusreaktionen etabliert werden. Enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen konnten durch EC/ESI-MS-Experimente verstanden und aufgeklärt werden. Dazu diente die elektrochemisch initiierte Oxidation

einer einfachen phenolischen Verbindung (3-Methylcatechol), die dann im aktivierten Zustand eine Heterokopplung (Michael-Addition) mit einem Amin (*n*-Hexylamin) einging. Dabei wurden verschiedene Reaktionsparameter wie saure und basische Bedingungen sowie Substratverhältnisse variiert, um die C-N-Kopplung ausführlich zu charakterisieren. Es konnten Umsätze von bis zu 93% im negativen und 31% im positiven Ionisationsmodus für das gewünschte Produkt mit einer 4-Elektronen-4-Protonen-Oxidation erhalten werden. Das Kopplungsprodukt mit einer 2-Elektronen-2-Protonen-Oxidation wurde stets als Nebenprodukt erhalten. Bei Synthesen mit höheren Konzentrationen wurde ein Zwei-Schritt-Verfahren durchgeführt, um erste Scale-Up-Experimente durchführen zu können und Einflüsse von Substratkonzentrationen auf die Kopplungsreaktion abschätzen zu können. Hier zeigte sich, dass die Bildung des Nebenprodukts unterdrückt werden konnte, aber eine zweifache Aminierung an das 3-Methylcatechol auftrat.

Die vorgestellten Publikationen zeigen das große Potential von EC/ESI-MS für mögliche Anwendungen zur Simulation von biologischen Reaktionen. Denkbar ist die Untersuchung von Polyphenolen zur Nachahmung von Metabolismusreaktionen. Viele mit der Nahrung aufgenommene Polyphenole werden im Verdauungstrakt vor der Absorption metabolisiert. Diese Umwandlung ist grundlegend für die Absorption und moduliert die biologische Aktivität dieser Substanzen, denn eine Vielzahl an neuen chemischen Verbindungen aus den Polyphenolen können durch die Darmbakterien hergestellt werden. Diese zeigen in der Regel eine weitaus bessere Bioverfügbarkeit als ihre Ausgangssubstanzen aus den Pflanzen und könnten für die biologische Wirkung verantwortlich sein. Dies zeigt deutlich, dass ein besseres Verständnis für den Polyphenolmetabolismus durch Darmbakterien nötig ist, denn dieser spielt die Hauptrolle in der biologischen Aktivität vieler sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Erst danach ist es sinnvoll, die Auswirkungen dieser Konjugate oder Metabolite der Polyphenole auf relevante Gewebe, Zellen oder Proteine sowie in der Leber oder Niere als Zielwirkorte zu untersuchen. Die Kenntnisse über Resorption und Stoffwechsel der Polyphenole beim Menschen sind gegenwärtig noch unzureichend.

Viele weitere Polyphenole wie Benzoessäurederivate, Zimtsäurederivate und Stilbenderivate zeigen redoxaktive Eigenschaften, die in zukünftigen Arbeiten näher betrachtet werden könnten. Selbst die Gruppe der Flavonoide ist erst zum Teil untersucht worden. Einige Flavanole können ein gleich aktives oder sogar noch aktiveres Oxidationsverhalten als Quercetin besitzen, wenn ihr Ring B eine Pyrogallol-Einheit besitzt und/oder eine Hydroxylgruppe am C₃-Atom am Ring C eine Gallolyleinheit trägt. Auch Anthocyanidine und ihre 3-O-Glykoside können gleich aktiv wie Quercetin sein, solange der Ring B eine Catechol- oder Pyrogalloleinheit enthält [85]. Das Forschungsfeld der Polyphenole mit weit über 100000 Substanzen ist weit, sodass zusammenhängende Betrachtungen zur antioxidativen Aktivität und Oxidationskapazität der einzelnen Polyphenolklassen künftig weiterhin wohl auf ausgewählte Vertreter beschränkt sein werden.

Abschließend sei erwähnt, dass die Aktivität der pflanzlichen Polyphenole in der Ernährung von vielen Faktoren abhängt, nicht nur von ihrer speziellen Struktur und der

chemischen Reaktivität, dem Redoxpotential gegenüber der wechselwirkenden Spezies, der Konzentration und der Löslichkeit, sondern vor allem vom Metabolismus im menschlichen Körper und somit von der Bioverfügbarkeit.

Folglich sollte die Antioxidantienhypothese zur Erklärung der positiven Wirkung der Polyphenole auf die menschliche Gesundheit hinterfragt werden. Die Lebensmittelindustrie und die Hersteller von Nahrungsergänzungsmitteln nutzten diese Begründung in den letzten Jahrzehnten als erfolgreichen Werbeträger zur Vermarktung polyphenolreicher Nahrungsmittel und Produkte, obwohl eine sehr geringe Bioverfügbarkeit in dem Verdauungstrakt unter bisherigem Kenntnisstand vorliegt.

5. Literatur

- [1] Mollet, B.; Rowland, I. (2002). *Functional foods: at the frontier between food and pharma*. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 483-485.
 - [2] Hahn, A.; Wolters, M. (2001). *Functional Foods - Lebensmittel der Zukunft? Maßgeschneiderte Ernährung*. Biol. Unserer Zeit 31, 356-366.
 - [3] Watzl, B.; Leitzmann, C.: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 3., unveränderte Auflage, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 2005.
 - [4] Siro, I.; Kapolna, E.; Kapolna, B.; Lugasi, A. (2008). *Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review*. Appetite 51, 456-467.
 - [5] Mathias, D.: *Fit von 1 bis Hundert: Ernährung und Bewegung - Aktuelles medizinisches Wissen zur Gesundheit*. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2015.
 - [6] Menrad, K. (2003). *Market and marketing of functional food in Europe*. J. Food Eng. 56, 181-188.
 - [7] Kwak, N.-S.; Jukes, D. J. (2001). *Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept*. Food Control 12, 99-107.
 - [8] Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 (2006). *Verordnung über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel*. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1924-20121129>.
Zugriffsdatum 01/2016.
 - [9] Verordnung (EU) Nr. 432/2012 (2012). *Verordnung zur Festlegung einer Liste zulässiger anderer gesundheitsbezogener Angaben über Lebensmittel als Angaben über die Reduzierung eines Krankheitsrisikos sowie die Entwicklung und die Gesundheit von Kindern*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:136:0001:0040:DE:PDF>.
Zugriffsdatum 01/2016.
 - [10] Hüsing, B.; Menrad, K.; Menrad, M.; Scheef, G. (1999). *Functional Foods - Funktionelle Lebensmittel. Gutachten im Auftrag des TAB*. Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag TAB-Hintergrundpapier Nr. 4, 1-191.
 - [11] Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H.: *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006.
 - [12] Baltes, W.; Matissek, R.: *Lebensmittelchemie*. 7., vollständig überarbeitete Auflage, Springer, Heidelberg, 2011.
 - [13] Schwedt, G.: *Taschenatlas der Lebensmittelchemie*. 2., vollständig überarbeitet und erweiterte Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
-

- [14] Watson, R. R.: *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. First Edition, Academic Press / Elsevier, Amsterdam [u.a.], 2014.
 - [15] Watzl, B.; Rechkemmer, G. (2001). *Flavonoide*. Ernährungs-Umschau 48, 499-503.
 - [16] Täufel, A.; Tunger, L.; Zobel, M.: *Lebensmittel-Lexikon*. 1. Auflage, VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1979.
 - [17] Herrmann, K. (1970). *Über das Vorkommen and die Bedeutung von Flavonen, Flavonolen and Flavanonen in Lebensmitteln*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 144, 191-202.
 - [18] Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N. (2000). *Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration*. J. Nutr. 130, 2243-2250.
 - [19] Böhm, H.; Boeing, H.; Hempel, J.; Raab, B.; Kroke, A. (1998). *Falvonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen*. Z. Ernährungswiss. 37, 147-163.
 - [20] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2005). *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45, 287-306.
 - [21] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996). *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radical Biol. Med. 20, 933-956.
 - [22] Pietta, P.-G. (2000). *Flavonoids as antioxidants*. J. Nat. Prod. 63, 1035-1042.
 - [23] Heinze, J. (1984). *Cyclovoltammetrie - die "Spektroskopie" des Elektrochemikers*. Angew. Chem. 96, 823-840.
 - [24] Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. (2001). *Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants*. J. Am. Chem. Soc. 123, 1173-1183.
 - [25] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. (2004). *Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism*. J. Phys. Chem. A 108, 4916-4922.
 - [26] Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. (2011). *The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants*. Food Chem. 125, 288-306.
 - [27] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. (2004). *Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent*. Theor. Chem. Acc. 111, 210-216.
 - [28] Justino, G. C.; Vieira, A. J. (2010). *Antioxidant mechanisms of Quercetin and Myricetin in the gas phase and in solution - a comparison and validation of semi-empirical methods*. J. Mol. Model. 16, 863-876.
-

-
- [29] Amic, D.; Stepanic, V.; Lucic, B.; Markovic, Z.; Dimitric Markovic, J. M. (2013). *PM6 study of free radical scavenging mechanisms of flavonoids: why does O-H bond dissociation enthalpy effectively represent free radical scavenging activity?* J. Mol. Model. 19, 2593-2603.
- [30] Alvarez-Diduk, R.; Ramirez-Silva, M. T.; Galano, A.; Merkoci, A. (2013). *Deprotonation mechanism and acidity constants in aqueous solution of flavonols: a combined experimental and theoretical study.* J. Phys. Chem. B 117, 12347-12359.
- [31] Kummer, S.; Ruth, W.; Kühn, O.; Kragl, U. (2014). *Comparison of Electrochemical Oxidation of Flavonols and Calculated Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water.* Electroanalysis 26, 910-918.
- [32] Zhou, F.; Van Berkel, G. J. (1995). *Electrochemistry combined online with electrospray mass spectrometry.* Anal. Chem. 67, 3643-3649.
- [33] Pitterl, F.; Chervet, J.-P.; Oberacher, H. (2010). *Electrochemical simulation of oxidation processes involving nucleic acids monitored with electrospray ionization-mass spectrometry.* Anal. Bioanal. Chem. 397, 1203-1215.
- [34] Mautjana, N. A.; Looi, D. W.; Eyler, J. R.; Brajter-Toth, A. (2009). *Sensitivity of positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) in the analysis of purine bases in ESI MS and on-line electrochemistry ESI MS (EC/ESI MS).* Electrochim. Acta 55, 52-58.
- [35] Mautjana, N. A.; Estes, J.; Eyler, J. R.; Brajter-Toth, A. (2008). *One-Electron Oxidation and Sensitivity of Uric Acid in On-Line Electrochemistry and in Electrospray Ionization Mass Spectrometry.* Electroanalysis 20, 2501-2508.
- [36] Looi, D. W.; Eyler, J. R.; Brajter-Toth, A. (2011). *Electrochemistry-electrospray ionization FT ICR mass spectrometry (EC ESI MS) of guanine-tyrosine and guanine-glutathione crosslinks formed on-line.* Electrochim. Acta 56, 2633-2640.
- [37] Mautjana, N. A.; Estes, J.; Eyler, J. R.; Brajter-Toth, A. (2008). *Antioxidant Pathways and One-Electron Oxidation of Dopamine and Cysteine in Electrospray and On-Line Electrochemistry Electrospray Ionization Mass Spectrometry.* Electroanalysis 20, 1959-1967.
- [38] Deng, H.; Berkel, G. J. V. (1999). *A Thin-Layer Electrochemical Flow Cell Coupled On-Line with Electrospray-Mass Spectrometry for the Study of Biological Redox Reactions.* Electroanalysis 11, 857-865.
- [39] Mautjana, N. A.; Looi, D. W.; Eyler, J. R.; Brajter-Toth, A. (2010). *Sensitivity of positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry in the analysis of thiol metabolites.* Electroanalysis 22, 79-89.
- [40] Baumann, A.; Karst, U. (2010). *Online electrochemistry/mass spectrometry in drug metabolism studies: principles and applications.* Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 6, 715-731.
-

- [41] Baumann, A.; Lohmann, W.; Schubert, B.; Oberacher, H.; Karst, U. (2009). *Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods*. J. Chromatogr. A 1216, 3192-3198.
 - [42] Jurva, U.; Wikström, H. V.; Bruins, A. P. (2000). *In vitro mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 529-533.
 - [43] Hoffmann, T.; Hofmann, D.; Klumpp, E.; Küppers, S. (2011). *Electrochemistry-mass spectrometry for mechanistic studies and simulation of oxidation processes in the environment*. Anal. Bioanal. Chem. 399, 1859-1868.
 - [44] Lohmann, W.; Dötzer, R.; Gütter, G.; Van Leeuwen, S. M.; Karst, U. (2009). *On-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry for the simulation of pesticide metabolism*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 138-145.
 - [45] Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U. *Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS*. Electroanalysis 27, in press.
DOI: 10.1002/elan.201501055.
 - [46] Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U. *Electrochemical Initiated C-N Coupling of 3-Methylcatechol and n-Hexylamine in a Flow Cell Monitored with ESI-MS*. Electroanalysis, in press.
DOI: 10.1002/elan.201600035.
 - [47] Herter, S.; Mikolasch, A.; Michalik, D.; Hammer, E.; Schauer, F.; Bornscheuer, U.; Schmidt, M. (2011). *C-N coupling of 3-methylcatechol with primary amines using native and recombinant laccases from Trametes versicolor and Pycnoporus cinnabarinus*. Tetrahedron 67, 9311-9321.
 - [48] Illner, S.; Plagemann, R.; Saling, P.; Kragl, U. (2014). *Eco-efficiency analysis as a reaction-engineering tool - Case study of a laccase-initiated oxidative C-N coupling*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 102, 106-114.
 - [49] Trepel, F. (2004). *Ballaststoffe: Mehr als ein Diätmittel*. Wien. Klin. Wochenschr. 116, 465-476.
 - [50] Sokolova, R.; Ramesova, S.; Degano, I.; Hromadova, M.; Gal, M.; Zabka, J. (2012). *The oxidation of natural flavonoid quercetin*. Chem. Commun. 48, 3433-3435.
 - [51] Timbola, A. K.; Souza, C. D.; Giacomelli, C.; Spinelli, A. (2006). *Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution*. J. Braz. Chem. Soc. 17, 139-148.
 - [52] Zare, H. R.; Namazian, M.; Nasirizadeh, N. (2005). *Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies*. J. Electroanal. Chem. 584, 77-83.
 - [53] Brett, A. M. O.; Ghica, M.-E. (2003). *Electrochemical oxidation of quercetin*. Electroanalysis 15, 1745-1750.
-

-
- [54] Jorgensen, L. V.; Cornett, C.; Justesen, U.; Skibsted, L. H.; Dragsted, L. O. (1998). *Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring*. Free Rad. Res. 29, 339-350.
- [55] Maza, E. M.; Moressi, M. B.; Fernandez, H.; Zon, M. A. (2012). *Electrochemical oxidation of fisetin: Studies related to its adsorption on glassy carbon electrodes*. J. Electroanal. Chem. 675, 11-17.
- [56] Markovic, Z. S.; Mentus, S. V.; Dimitrici Markovici, J. M. (2009). *Electrochemical and density functional theory study on the reactivity of fisetin and its radicals: implications on in vitro antioxidant activity*. J. Phys. Chem. A 113, 14170-14179.
- [57] Mendoza-Wilson, A. M.; Santacruz-Ortega, H.; Balandran-Quintana, R. R. (2011). *Relationship between structure, properties, and the radical scavenging activity of morin*. J. Mol. Struct. 995, 134-141.
- [58] Janeiro, P.; Brett, A. M. O. (2005). *Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media*. Electroanalysis 17, 733-738.
- [59] Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Hara, Y.; Simic, M. G. (1996). *Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2497-2504.
- [60] Pannala, A. S.; Chan, T. S.; O'Brien, P. J.; Rice-Evans, C. A. (2001). *Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 1161-1168.
- [61] Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffers, A. E.; Rietjens, I. M. (2001). *The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones*. Free Radical Biol. Med. 31, 869-881.
- [62] Musialik, M.; Kuzmich, R.; Pawlowski, T. S.; Litwinienko, G. (2009). *Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids*. J. Org. Chem. 74, 2699-2709.
- [63] Zhang, D.; Xie, L.; Jia, G.; Cai, S.; Ji, B.; Liu, Y.; Wu, W.; Zhou, F.; Wang, A.; Chu, L. (2011). *Comparative study on antioxidant capacity of flavonoids and their inhibitory effects on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro*. Eur. J. Med. Chem. 46, 4548-4558.
- [64] Zhang, D.; Chu, L.; Liu, Y.; Wang, A.; Ji, B.; Wu, W.; Zhou, F.; Wei, Y.; Cheng, Q.; Cai, S. (2011). *Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory*. J. Agric. Food Chem. 59, 10277-10285.
- [65] Markovic, Z.; Milenkovic, D.; Dorovic, J.; Dimitric Markovic, J. M.; Stepanic, V.; Lucic, B.; Amic, D. (2012). *PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin*. Food Chem. 134, 1754-1760.
-

- [66] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856.
- [67] Zettersten, C.; Co, M.; Wende, S.; Turner, C.; Nyholm, L.; Sjöberg, P. J. (2009). *Identification and characterization of polyphenolic antioxidants using on-line liquid chromatography, electrochemistry, and electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Anal. Chem. 81, 8968-8977.
- [68] Janeiro, P.; Corduneanu, O.; Brett, A. M. O. (2005). *Chrysin and (\pm)-taxifolin electrochemical oxidation mechanisms*. Electroanalysis 17, 1059-1064.
- [69] Utaka, M.; Takeda, A. (1985). *Copper (II)-catalysed oxidation of quercetin and 3-hydroxyflavone*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1824-1826.
- [70] Thurston, C. F. (1994). *The structure and function of fungal laccases*. Microbiology 140, 19-26.
- [71] Yaropolov, A.; Skorobogatko, O.; Vartanov, S.; Varfolomeyev, S. (1994). *Laccase*. Appl. Biochem. Biotechnol. 49, 257-280.
- [72] Witayakran, S.; Ragauskas, A. J. (2009). *Synthetic applications of laccase in green chemistry*. Adv. Synth. Catal. 351, 1187-1209.
- [73] Kunamneni, A.; Camarero, S.; Garcia-Burgos, C.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. (2008). *Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis*. Microb. Cell Fact. 7, 1.
- [74] Wellington, K. W., *Application of Laccases in Organic Synthesis: A Review*, in: *Green Chem.* (R. Luque, ed.), Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.
- [75] Couto, S. R.; Herrera, J. L. T. (2006). *Industrial and biotechnological applications of laccases: a review*. Biotechnol. Adv. 24, 500-513.
- [76] Upadhyay, P.; Shrivastava, R.; Agrawal, P. K. (2016). *Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase*. 3 Biotech 6, 1-12.
- [77] Hahn, V.; Mikolasch, A.; Wende, K.; Bartrow, H.; Lindequist, U.; Schauer, F. (2010). *Derivatization of the azole 1-aminobenzotriazole using laccase of Pycnoporus cinnabarinus and Myceliophthora thermophila: influence of methanol on the reaction and biological evaluation of the derivatives*. Biotechnol. Appl. Biochem. 56, 43-48.
- [78] Rogalski, J.; Jozwik, E.; Hatakka, A.; Leonowicz, A. (1995). *Immobilization of laccase from Phlebia radiata on controlled porosity glass*. J. Mol. Catal. A: Chem. 95, 99-108.
- [79] Palmeiri, G.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Desiderio, B.; Nittii, G.; Cannio, R.; Sannia, G. (1993). *Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 632-636.
- [80] Nematollahi, D.; Golabi, S. M. (2001). *Investigation of the Electromethoxylation Reaction Part 2: Electrochemical Study of 3-Methylcatechol and 2,3-Dihydroxybenzaldehyde in Methanol*. Electroanalysis 13, 1008-1015.
-

- [81] Nematollahi, D.; Golabi, S. (1996). *Electrochemical study of catechol and 4-methylcatechol in methanol. Application to the electro-organic synthesis of 4,5-dimethoxy- and 4-methoxy-5-methyl-o-benzoquinone*. J. Electroanal. Chem. 405, 133-140.
 - [82] Niedermeyer, T. H.; Lalk, M. (2007). *Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Comparison of laccase catalyzed amination with known chemical routes to aminoquinones*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 45, 113-117.
 - [83] Niedermeyer, T. H.; Mikolasch, A.; Lalk, M. (2005). *Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of p-hydroquinones and primary aromatic amines*. J. Org. Chem. 70, 2002-2008.
 - [84] Mikolasch, A.; Hammer, E.; Jonas, U.; Popowski, K.; Stielow, A.; Schauer, F. (2002). *Synthesis of 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase*. Tetrahedron 58, 7589-7593.
 - [85] Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegu, L. (2011). *Pflanzliche Polyphenole: chemische Eigenschaften, biologische Aktivität und Synthese*. Angew. Chem. 123, 610-646.
-

6. Publikationen

Teile dieser kumulativen Dissertation wurden in internationalen chemischen Fachjournals publiziert oder auf wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert. Kapitel 6 umfasst die Publikationen I - III zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen. Die Oxidation von Polyphenolen (Flavonole) werden in Publikation I und II betrachtet. Die Reaktionsmechanismen werden anhand von quantenchemischen Berechnungen und der Kopplung von Elektrochemie mit Massenspektrometrie erforscht. Die Oxidation eines einfachen Phenols (3-Methylcatechol) wird in Publikation III ebenfalls mit der Kopplung von Elektrochemie mit Massenspektrometrie umfänglich betrachtet. Am Anfang jedes Artikels ist eine kurze Zusammenfassung gegeben und der Autorenanteil herausgestellt.

		Contribution
I	Kummer, S.; Ruth, W.; Kühn, O.; Kragl, U. (2014). <i>Comparison of Electrochemical Oxidation of Flavonols and Calculated Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water</i> . <i>Electroanalysis</i> 26, 910-918. DOI: 10.1002/elan.201300631	Full paper 65%
II	Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U. (2015). <i>Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS</i> . <i>Electroanalysis</i> 27, in press. DOI: 10.1002/elan.201501055	Full paper 70%
III	Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U. <i>Electrochemical Initiated C-N Coupling of 3-Methylcatechol and n-Hexylamine in a Flow Cell Monitored with ESI-MS</i> . <i>Electroanalysis</i> . DOI: 10.1002/elan.201600035	Full paper 70%

Publikation I

Full Paper *Electroanalysis*, 2014, **26**, 910-918.

Comparison of Electrochemical Oxidation of Flavonols and Calculated Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water

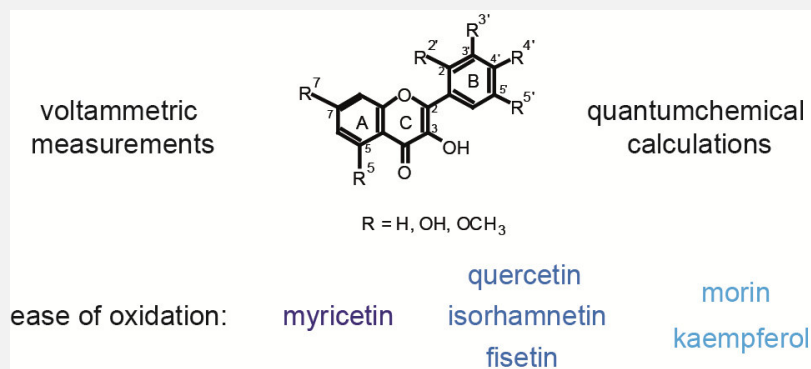
Sina Kummer (65%), Dr. Wolfgang Ruth (5%), Prof. Dr. Oliver Kühn (20%), Prof. Dr. Udo Kragl (10%)

Received: December 16, 2013, Accepted: February 13, 2014

DOI: 10.1002/elan.201300631

Table of Contents

The redox behaviour of myricetin, quercetin, isorhamnetin, fisetin, morin and kaempferol was investigated by cyclic and differential pulse voltammetry. Quantum chemical calculations of proton affinities and electron transfer enthalpies were performed to identify possible reactive sites and radical species to compare them with measured oxidation potentials of the flavonols.



Contribution (65%)

I have contributed the majority to the manuscript and performed all experiments and quantum chemical calculations. Prof. Dr. O. Kühn explained me the procedure of the calculations and supervised them. Dr. W. Ruth and Prof. Dr. U. Kragl had the initial idea to oxidise flavonols. Prof. Dr. U. Kragl and Prof. Dr. O. Kühn revised the manuscript through final corrections.

Comparison of Electrochemical Oxidation of Flavonols and Calculated Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water

Sina Kummer,^[a] Wolfgang Ruth,^[a] Oliver Kühn,^[b] and Udo Kragl^{*[a]}

Abstract: Flavonols, a class of flavonoids, are present in flowers, fruits and vegetables. They are jointly responsible for antioxidant activity as free radical acceptors. The redox behaviour of myricetin, quercetin, isorhamnetin, fisetin, morin and kaempferol is investigated using cyclic and differential pulse voltammetry. Quantum chemical calculations of proton affinities and electron transfer en-

thalpies were performed to identify possible reactive sites and radical species to compare them with measured oxidation potentials of the flavonols. Regarding to their chemical structure, these flavonols showed an oxidation order: myricetin > quercetin > isorhamnetin > fisetin > morin > kaempferol.

Keywords: Density functional calculations • Deprotonation • Flavonoids • *SPLET* • Voltammetry

1 Introduction

Antioxidant properties of vegetable food and spices are often the result of phenol ingredients. Here the antioxidant effect is based on flavonoids and phenolic acids [1]. Flavonoids are a class of plant secondary metabolites, fulfilling important tasks in warding off pests or diseases, as well as attracting pollen distributing insects as colourings and flavourings [2]. In conglomeration of different species they are mostly located in the outer leaves of plants and partly in flowers and fruits as a yellow pigment [3]. Flavonoids are benzo- γ -pyrone derivatives, consisting of two benzene rings (A and B) linked by a pyrane ring (C). Especially the flavonols are characterised by a hydroxyl group at the C₃ position and by a C₂=C₃ double bond in the ring C (Figure 1). Due to the variable number and positions of hydroxyl groups at the backbone, there are many possible naturally occurring aglycones of flavonols. Selected species are listed in Table 1.

Structure-antioxidant activity investigations of flavonoids indicated, that derivatives with a 2,3 double bond in conjugation with a 4-oxo function and an additional hy-

Table 1. Structural data of flavonols.

Flavonol	R ⁵	R ⁷	R ^{2'}	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}
Quercetin	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	OH	H	OH	OH	OH
Isorhamnetin	OH	OH	H	OCH ₃	OH	H
Fisetin	H	OH	H	OH	OH	H
Morin	OH	OH	OH	H	OH	H
Kaempferol	OH	OH	H	H	OH	H

droxyl group at C₃ in the ring C exhibit a high antioxidant potency [4].

Two main mechanisms are known, which describe the oxidation of flavonols: 1) H-atom transfer (*HAT*), where the Bond Dissociation Enthalpy (*BDE*) is an important factor, and 2) single-electron transfer (*SET*) with the Ionisation Potential (*IP*) being the key parameter. Thus, *BDE* and *IP* are significant factors in determining the effectiveness of antioxidants [5]. Systematic theoretical studies of some phenolic antioxidants in gas phase concluded that *HAT* is the dominant mechanism responsible for their antioxidant behaviour [5–9]. However, only a few of these studies have taken into account the solvent environment and especially within a continuum model [10,11]. A third mechanism, not exhaustively studied so far, is preferred in water because of the charge separa-

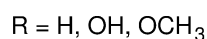
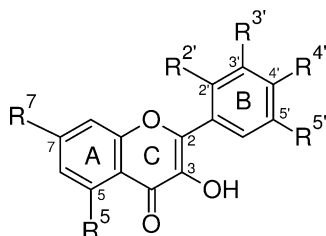


Fig. 1. Flavonol basic structure.

[a] S. Kummer, W. Ruth, U. Kragl
University of Rostock, Institute of Chemistry
D-18051 Rostock, Germany
*e-mail: udo.kragl@uni-rostock.de

[b] O. Kühn
University of Rostock, Institute of Physics
D-18051 Rostock, Germany

tion, i.e. sequential proton loss electron transfer (*SPLET*) [12–15]. Here in a first step deprotonation of the flavonoid molecule occurs resulting in an anion. This step is governed by the proton affinity (*PA*). It is followed by an electron transfer step to give a radical. The efficiency of the latter is characterized by electron transfer enthalpy (*ETE*).

Due to the electroactive behaviour of flavonoids, the antioxidant activity can be investigated by electrochemical methods. Here, even small differences in molecule structure cause different redox activity [6]. In this study the electrochemical behaviour of selected flavonols is investigated by using cyclic (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). In order to obtain information on the energetic and about possible reactive sites of the molecules and their radical species quantum chemical calculations are performed. In contrast to most previous theoretical work we take into account one water molecule of the solvation shell explicitly, i.e. consider the process of formation of hydronium within a continuum model of solvation.

The comparison between theoretical and experimental results is focused on the qualitative assessment of the validity of the *SPLET* mechanism. Thereby we will use the model of a 1:1 flavonol:H₂O complex. Needless to say that this is, of course, quite a simplification of the solvation shell and its rearrangement upon deprotonation of the flavonol. Therefore we can expect to capture the energetic of the *SPLET* process only qualitatively. Nevertheless, we will aim to establish a correlation to the trend in oxidation potential change for the different flavonols.

2 Experimental

2.1 Chemicals

Quercetin anhydrous, myricetin, isorhamnetin, fisetin, morin hydrate, kaempferol and sodium phosphate monobasic were received from Sigma-Aldrich, sodium phosphate dibasic from Fluka Analytical and ethanol from Merck. All chemicals were obtained in highest available purity and used as received.

2.2 Sample Preparation

The supporting electrolytes were solutions consisting of phosphate buffer and ethanol. Flavonoid standards, reaching a final concentration of 1 mM in every solution, were first dissolved in 4 mL ethanol and then filled up with 6 mL phosphate buffer of ionic strength 0.1 M at pH 7.4. The final pH of the solution was pH 8.2. Higher buffer concentration would cause inadequate curves in the voltammetric scans, thus a lower buffer capacity and a slightly higher pH were a reasonable compromise. A fixed pH value was necessary, because flavonoid systems have pH dependencies in voltammetric measurements concerning their peak potential [16–22]. The pH measurements were examined with a pH 3210 pH-meter from

WTW, using a pH glass electrode model IJ44C and calibrated with technical buffer from WTW.

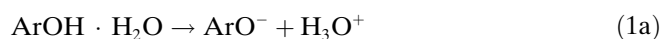
2.3 Measurements

CV and DPV measurements were carried out by a PalmSens Electrochemical Sensor with PalmSensPC 2.33 software. A three-electrode system, consisting of a glassy carbon electrode (2 mm diameter) as working electrode, an Ag/AgCl (saturated KCl) electrode as reference one and a platinum grid as an auxiliary electrode, was used. All measurements were performed without stirring at room temperature (about 20 °C) from −0.7 V to +1 V. The cell volume was 10 mL. Some oxidation products adsorb on the electrode surface, therefore the glassy carbon electrode was polished with grind paper before each measurement. Cyclic voltammograms were recorded at scan rates of 200 mV/s, 100 mV/s, 50 mV/s, 20 mV/s and 10 mV/s. Each cyclic voltammogram was scanned five times but only the last scan was analysed to consider no alteration. In all cases the first scan showed a striking deviation with respect to scan number two till five. Differential pulse voltammograms were scanned once, scan rates ranging from 100 to 5 mV/s, pulse width 70 ms and pulse amplitude 25 mV.

2.4 Quantum Chemistry Calculations

All quantum chemistry calculations have been performed using density functional theory (DFT) with the hybrid B3LYP exchange-correlation functional and a 6-311++G** basis set as implemented in Gaussian 09 [23]. The effect of the solvent was treated within the polarizable continuum model (PCM) [24]. All structures have been fully optimised including the PCM. Only small differences were calculated between the solvents water and ethanol for a representative set of structure. Thus subsequent calculations were done in water, because it occupies 60 % in mixed solutions.

Forming a hydrogen bond between the surrounding water and the flavonol should account for the fact that OH bond cleavage will give a negatively charged flavonol in the first step at basic pH-values [22] and at least a hydronium ion, H₃O⁺. Therefore, *PA*s for OH bond cleavage starting from a 1:1 flavonol:H₂O complex have been calculated according to:



$$PA = H(\text{ArO}^-) + H(\text{H}_3\text{O}^+) - H(\text{ArOH} \cdot \text{H}_2\text{O}) \quad (1b)$$

The enthalpy of the hydronium ion was calculated with a value of −76.8 Hartrees. Deprotonation of all OH groups has been considered. In each calculation the H₂O molecule is placed close to the respective OH group. In a second step *ETE* was calculated according to:



$$ETE = H(\text{ArO}^\bullet) + H(e^-) - H(\text{ArO}^-) \quad (2b)$$

The hydration enthalpy of the electron was taken from the literature as -56.3 kcal/mol [12]. In (1b) and (2b) H is the respective enthalpy calculated in harmonic approximation with respect to the vibrational degrees of freedom.

3 Results and Discussion

The results of the voltammetric experiments are summarised in Table 2.

The cyclic and differential pulse voltammograms in pH buffer about 8.2 are shown in Figure 2. Due to limited solubility the corresponding flavonols were first solved in ethanol and then filled up with aqueous buffer to ensure the required concentration. Thus ethanol was used as a co-solvent and a final mixture about 40% ethanol and 60% water was achieved.

It has been shown in literature that the oxidation of flavonoids, particularly of flavonols, occurs at the hydroxyl groups of ring B. This relates to the oxidation of the catecholic unit at the ring B [25], yielding a stable *ortho*-semiquinone [26] through electron delocalization via 2,3-double bond conjugated with a 4-oxo-group. The pres-

ence of a 3-hydroxyl group in the heterocyclic ring [27] achieves the coupling between ring B and C [25]. Furthermore, the additional presence of a 5-hydroxyl group at ring A and a 3-hydroxyl group at ring C, forming hydrogen bonds with the keto group, enable maximal radical-scavenging potential and strongest radical absorption [28].

All selected flavonols are considered in detail in the following section. Special attention is paid to the determination of possible oxidised hydroxyl groups in comparison to related literature. Geometry optimised structures obtained from quantum chemical calculations are shown in Table 3 for the selected flavonols. Moreover, the calculations should underpin the assumption of possible oxidised hydroxyl groups of formed radicals with experimental data. Further, there is a differentiation between *ETE*, starting from deprotonated molecule to transfer an electron, and the total easiest process of *SPLET*. The present *ETE* calculations consider only the first proton electron transfer step to determine the reaction site, in contrast to experimental data described in literature focusing on two proton two electron transfer steps (see discussion below). On top of that a dependency of scan rate and peak height or peak potential is found in cyclic and differential pulse voltammetric scans (Figure 3).

3.1 Quercetin

Quercetin shows one peak in the cyclic voltammetric scans, a reverse peak indicates a reversible oxidation (Figure 2). In addition the differential pulse voltammetric study also yields an oxidation peak. There is obviously a saturation kinetics (Figure 3a) between scan rate and peak height in cyclic voltammetry. Thus the electrode process plays a more important role than the adsorption process of quercetin molecules on the electrode surface. A linear relation between scan rate and peak potential (Figure 3b) displays a diffusion controlled reaction in cyclic voltammetry. A potential relation between scan rate and peak height is found in differential pulse voltammetric scans (Figure 3c). Thus the oxidation of quercetin is controlled by diffusion in differential pulse voltammetric scans: the lower the scan rate is, the higher the peaks are. The transport of quercetin molecules from the bulk phase to the electrode lasts for a longer period of time at low scan rates and more oxidisable molecules reach the electrode surface than at high scan rates, where fewer molecules are available.

However, Brett and Ghica already characterised quercetin with electrochemical methods. They postulate a two electron two proton oxidation of the catechol moiety (4'- and 3'-OH group) for the first peak [20]. Contrary to that Sokolova et al. determined the oxidation of quercetin relates to the presence of its dissociation forms in solution: the undissociated molecule AH_2 is oxidized by a $2e^-/2H^+$ process at pH lower than 6.9, the dissociated form AH^- involves $2e^-/1H^+$ and $1e^-/1H^+$ at the dianion A^{2-} . Both dissociated forms AH^- and A^{2-} appear at pH higher than

Table 2. Voltammetric data of selected flavonols.

Flavonol	pH	Scan rate CV (mV/s)	CV E_{p1}^{ox} (V)	Scan rate DPV (mV/s)	DPV E_{p1}^{ox} (V)
Myricetin	8.2	200	0.099	100	0.039
		100	0.089	50	0.039
		50	0.074	20	0.039
		20	0.059	10	0.029
		10	0.049	5	0.004
Quercetin	8.3	200	0.179	100	0.119
		100	0.164	50	0.119
		50	0.154	20	0.119
		20	0.149	10	0.109
		10	0.144	5	0.104
Isorhamnetin	8.3	200	0.239	100	0.119
		100	0.204	50	0.119
		50	0.184	20	0.119
		20	0.179	10	0.119
		10	0.174	5	0.104
Fisetin	8.2	200	0.279	100	0.159
		100	0.224	50	0.159
		50	0.199	20	0.159
		20	0.184	10	0.149
		10	0.179	5	0.144
Morin	8.2	200	0.269	100	0.179
		100	0.264	50	0.199
		50	0.254	20	0.199
		20	0.244	10	0.199
		10	0.239	5	0.204
Kaempferol	8.3	200	0.339	100	0.219
		100	0.294	50	0.219
		50	0.274	20	0.219
		20	0.254	10	0.209
		10	0.249	5	0.199

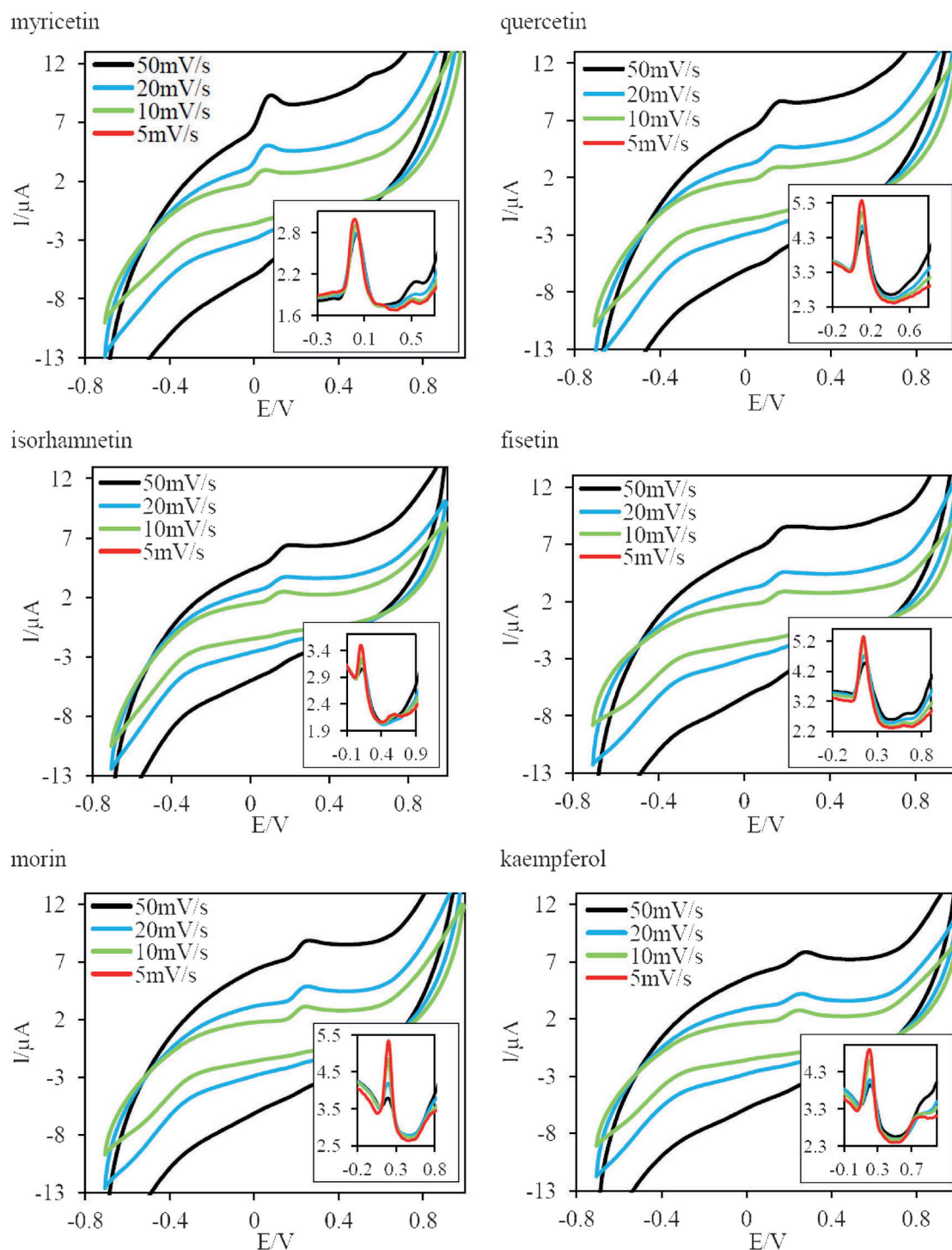


Fig. 2. CVs and DPVs of 1 mM flavonols in phosphate buffer.

6.9 to give 3,4-dihydroxybenzoic acid as the main stable oxidation product in the presence of air [22].

The present quantum chemical calculations in water favour a deprotonation of 4'-OH group with the lowest *PA* value of 54.7 kcal/mol (see Table 3). Lowest *ETE* values are calculated for both 3'- and 3-OH group (45.8 kcal/mol) starting from the formed anion. The optimised structure for quercetin is a planar structure includ-

ing all related anions and radicals. The conformation obtained upon a 180° rotation around the C2–C1' bond was also inspected in this study. In accordance with previous calculations [10,11] it is found that this conformation is essentially isoenergetic (0.1 kcal/mol less stable) to the structure shown in Table 3. Furthermore, Gibbs free energies of reaction for each possible successive deprotonation in aqueous solution were calculated by Alvarez-

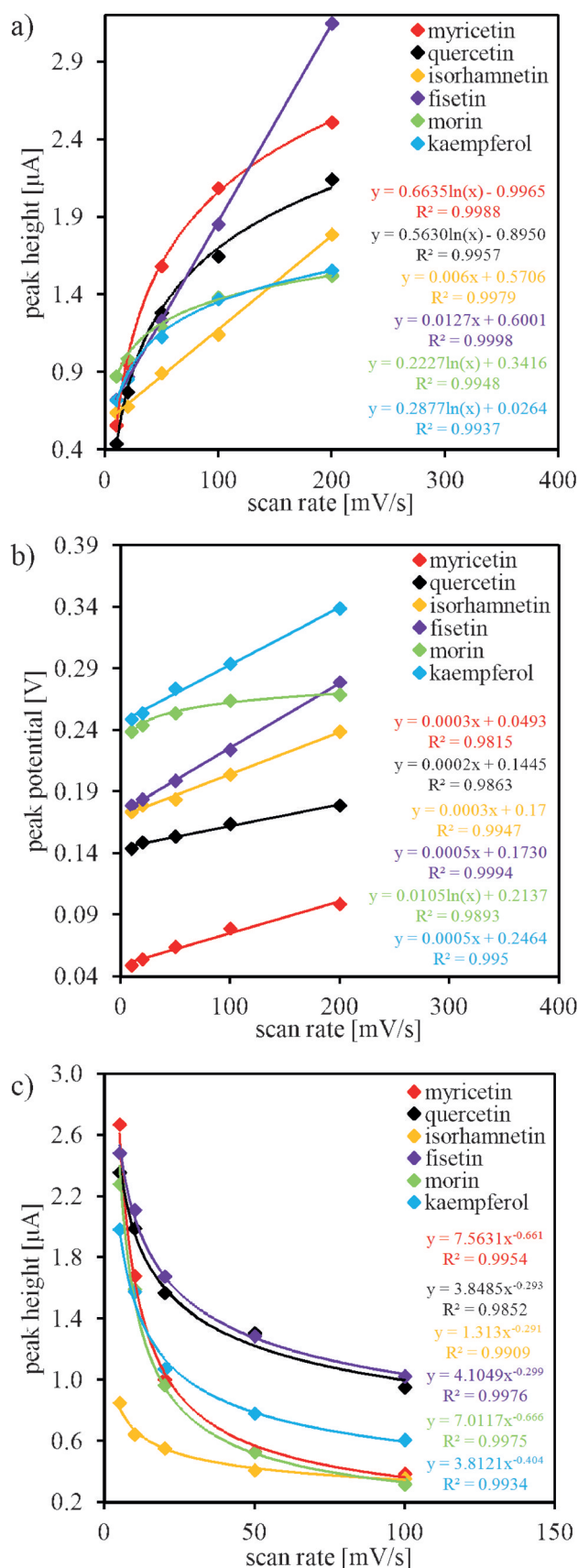
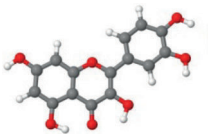
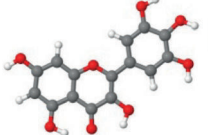
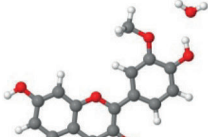
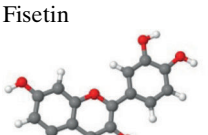
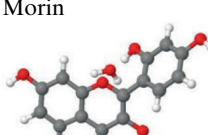
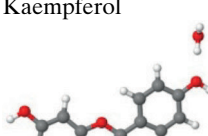


Fig. 3. Influence of the scan rate on peak height (a, c) and peak potential (b) in cyclic (a, b) and differential pulse (c) voltammetry scans.

Table 3. Optimised structure with flavonol:H₂O complex for the case of easiest deprotonation; *PA* and *ETE* values in kcal/mol for different sites of the molecules obtained in water of selected flavonols.

Optimised structure	OH group	<i>PA</i>	<i>ETE</i>	<i>SPLET</i> = <i>PA</i> + <i>ETE</i>
	3'	57.6	45.8	103.4
	4'	54.7	48.6	103.3
	3	56.1	45.8	101.9
	3'	58.6	47.8	106.4
	4'	51.0	47.9	98.9
	5'	54.1	50.2	104.3
	3	53.4	46.2	99.6
	4'	54.7	47.7	102.4
	3	56.7	44.9	101.6
	3'	57.5	46.3	103.8
	4'	51.1	49.3	100.4
	3	58.8	44.2	103.0
	2'	54.3	52.9	107.2
	4'	54.4	53.4	107.8
	3	56.5	45.8	102.3
	4'	51.4	51.9	103.3
	3	56.7	45.5	102.2

Diduk et al. to obtain the lowest value for 4'-OH group. These authors also report a non-planar structure for quercetin molecule in water in contrast to the present finding [29].

3.2 Myricetin

The oxidation of myricetin studied by cyclic voltammetry shows two peaks at scan rates ranging from 200 to

10 mV/s and a reverse peak is hinted in every scan rate (Figure 2). In differential pulse voltammetric studies two oxidation peaks are clearer discernible. Further there are the same relationships between scan rate and peak height or peak potential like quercetin, effectuating the same phenomena (Figure 3).

Inasmuch as myricetin also possesses a catechol unit (actually a pyrogallol unit) at ring B similar to quercetin, it could correspond with an oxidation of hydroxyl groups in position 4' and 3' to form a quinone with a two electron two proton transition. The oxidation of myricetin is clearly much easier than quercetin, based on the pyrogallol unit. This might be due to a better stabilisation of the formed radical: an additional hydroxyl group in ring B (pyrogallol unit) enhances the antioxidant capacity even further [27].

Quantum chemical calculations indicate that the hydroxyl group at position 4' is deprotonated first with a *PA* value of 51.0 kcal/mol (Table 3). Next lowest values are obtained for 3- and 5'-OH group. All calculated anions are planar, except 5'-anion, where ring B is slightly twisted relative to the rest of the molecule. The lowest *ETE* is calculated for 3-OH group with 46.2 kcal/mol. All radicals are nonplanar having a deviation by very few degrees, except 3'-radical with 11 degrees torsion of ring B to the rest of the molecule.

Based on an assumed two electron two proton oxidation of the catechol moiety, involving the oxidation of the 5'- and 4'-OH groups at ring B with an *ETE* value of 126.4 kcal/mol for the first peak, the 3'-OH group at ring B possesses the third smallest *ETE* value reported by Justino and Vieira [10]. Therefore the second oxidation peak in both voltammetry measurements could explain the oxidation of this hydroxyl group according to [10].

3.3 Isorhamnetin

It should be pointed out, that isorhamnetin is not entirely soluble and thus a saturated solution was used instead.

In the obtained cyclic voltammograms isorhamnetin shows one oxidation peak at each scan rate (Figure 2). In differential pulse voltammograms besides the main oxidation peak also a second signal is identifiable. In contrast to quercetin and myricetin, isorhamnetin shows a linear correlation between scan rate and peak height in cyclic voltammetric scans (Figure 3). Thus oxidation products from isorhamnetin are fixed on the electrode surface and the adsorption kinetics plays a more important role rather than the electrode process.

Determining the peak potentials from quercetin and isorhamnetin, a methoxy group as a replacement of a hydroxyl group cannot stabilise the formed radical equally to a hydroxyl group in close proximity. The position of O-methylation at Ring B is critical, as the scavenging activity is manifestly very sensitive [30]. The presence of a methoxy group greatly enhances the electron-donating properties in the 4'-position [26].

Quantum chemical calculations estimate the lowest *PA* value of 54.7 kcal/mol for the 4'-OH group at ring B (Table 3). The configuration for isorhamnetin with the methyl group points towards the oxygen has been calculated and found to be less stable by 6 kcal/mol. The optimised structure exhibits a planar structure, including all formed radicals. The lowest *ETE* is obtained for 3-OH group with 44.9 kcal/mol. Notice that this is in contrast to gas-phase calculations from Zhang et al., which revealed the lowest *PA* value for 7-OH group with 76.8 kcal/mol [31].

3.4 Fisetin

Fisetin shows one oxidation peak in cyclic as well as in differential pulse voltammetric measurements. An additional second oxidation step as a small peak is observed in differential pulse voltammetric scans at higher potentials (Figure 2). Furthermore, the same behaviour can be ascertained at isorhamnetin (Figure 3).

The first peak correlates with the oxidation of the catecholic group at ring B, which involves the elimination of two electrons and two protons; the subsequent intramolecular rearrangement with the renewed catechol unit gives a new oxidisable species, which can be oxidised in the second step according to Markovic and co-workers [21].

The present calculations of *PA* values imply that 4'-OH group is deprotonated first (Table 3), underpinned by lowest *PA* values for 4'-OH group as active site from Amic et al. for fisetin [15]. The lowest *ETE* is calculated for 3-OH group followed by 3'-OH group in the present work. All calculated species are planar except the 3'-anion, where ring B is twisted by 11 degrees with respect to the rest of the molecule.

3.5 Morin

The morin molecule presents two hydroxyl groups at ring B, arranged in meta-position to each other. One oxidation peak is obtained in cyclic and in differential pulse voltammetric measurements (Figure 2). Contrary to quercetin and myricetin, morin shows a logarithmic relationship of scan rate and peak potential in cyclic voltammetric scans (Figure 3). It indicates a charge-transfer control, as the charge transfer at the electrode is slower than the mass transport. It depends on the scan rate and the molecule, if the quasi-reversible oxidation is controlled by diffusion or in this case by charge transfer.

Regarding to the stabilisation of the formed radical, the position of the hydroxyl groups at ring B is unfavourable. The first oxidation step of morin corresponds to the oxidation of the 2',4'-dihydroxyl moiety at ring B and involves one electron and one proton according to Janeiro and Brett [16].

Quantum chemical calculations from Alvarez-Diduk et al. underpin deprotonation of 2'-OH group first followed by 7-OH group [29]. In accordance, our calculations of *PA* attain also the lowest value for 2'-OH group

in water. But 4'-OH group shows almost the same value, so that no definite conclusion can be derived (Table 3). Morin is exceptional insofar as it has always a non-planar structure; the deviation from planarity is about 28 degrees (water molecule at 4'-OH) to 44 degrees (water molecule at 2'-OH) for neutral species. In this case also the non-hydrogen-bonded configuration is investigated, which is less stable by 0.6 kcal/mol. The anions have nearly the same deviations from planarity like their neutral species. Radicals show torsions about 16 degrees with respect to the rest of the molecules, except 2'-O[•] with 34 degrees. The lowest *ETE* is calculated for 3-OH group (45.8 kcal/mol). Markovic and co-worker determined 2'-OH or rather 3-OH group as easiest groups for *ETE* in water [13].

3.6 Kaempferol

Voltammetric scans of kaempferol show one peak (Figure 2). In differential pulse voltammetry one significant oxidation peak and a minor second oxidation peak at higher potentials at scan rates lower than 50 mV/s is found, even though there is a lone 4'-hydroxyl group at the ring B. Relationships between scan rate on peak height and peak potential are analogous with quercetin and myricetin (Figure 3).

Compounds containing a 4'-monohydroxyl group are less potent antioxidants. In the case of kaempferol, it has a relatively high activity compared with other monohydroxyl compounds due to the conjugation with the 3-hydroxyl group at ring C [26]. Its oxidation potential in voltammetric experiments is higher compared to quercetin.

Kaempferol has its lowest *PA* value for 4'-OH group with 51.4 kcal/mol (Table 3), which would be deprotonated first. In literature quantum chemical calculations are contradictory with our calculations by specifying 7-OH group before 4'-OH group [29]. The lowest *ETE* is calculated for 3-OH group with 45.5 kcal/mol. All calculated species are planar.

4 Conclusions

From the presented data a number of conclusions can be drawn.

1) The lowest oxidation potential arise, if three hydroxyl groups are located in direct vicinity at ring B (pyrogallol unit), as given in myricetin, which is the easiest one to

oxidise among this selected flavonols, shown in Figure 4. Quercetin with a catechol unit at ring B has the second lowest potential, followed by isorhamnetin. Obviously a methoxy group cannot stabilise the formed radical as well as a hydroxyl group next to another hydroxyl group at ring B, like in quercetin. Fisetin contains in contrast to quercetin only one hydroxyl group less at ring A, which obviously has an influence in radical stability shifting the oxidation potential to higher values. Without an OH-group in direct proximity to a 4'-hydroxyl group at ring B like in morin, the distinction of potentials between molecules with only 4'-OH group like in kaempferol is difficult. Consequently, peak potentials are almost identical for morin and kaempferol.

2) Hydroxyl groups at ring A are not oxidised under any conditions in our experiments, because the oxidation of 5-OH and 7-OH group occurs at higher potentials [16,20,21,26].

3) Regarding to the quantum chemical calculations the first deprotonation step in water is always occurring at 4'-OH group of ring B. This is despite the fact that two flavonols contain a lone OH group at ring B or three OH groups as in myricetin with a pyrogallol unit at ring B. According to literature, deprotonation of flavonoids and especially the ones with 7-OH or 4'-OH may exist at different protonation states [19]. *PA* calculations from Amic et al. [15] show a deprotonation of 7-OH group at ring A for each flavonol, except morin, where it is unspecified which hydroxyl group is deprotonated unequivocally (Table 4).

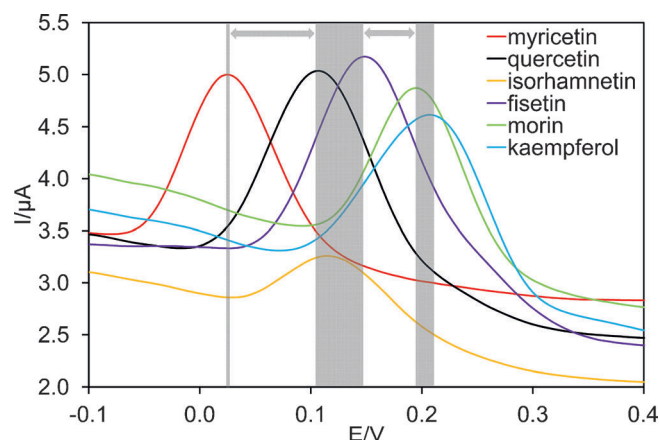


Fig. 4. DPVs of 1 mM flavonols in phosphate buffer at a scan rate of 10 mV/s.

Table 4. Order of E_{pl}^{ox} , *PA* and *SPLET* values. All values are given in kcal/mol.

E_{pl}^{ox}	<i>PA</i>		<i>SPLET</i>		<i>SPLET</i> (anion site)	
	This work	Ref. [15]	This work	Ref. [15]	This work	Ref. [15]
1 = Myricetin	1 (4': 51.0)	2 (7: 8.44)	1 (4': 98.9)	1 (4': 69.01)	1 (4': 98.9)	1 (7: 68.93)
2 = Quercetin	4 (4': 51.1)	4 (7: 9.02)	4 (4': 100.4)	4 (4': 70.79)	4 (4': 100.4)	2 (7: 70.62)
3 = Isorhamnetin	6 (4': 51.4)	1 (7: 9.57)	3 (3: 101.6)	2 (4': 71.06)	3 (4': 102.4)	4 (7: 70.66)
4 = Fisetin	5 (2': 54.3)	5 (3/2': 12.22)	2 (3: 101.9)	6 (3: 73.57)	2 (4': 103.3)	6 (7: 72.37)
5 = Morin	2 (4': 54.7)	6 (7: 13.24)	6 (3: 102.2)	5 (3: 75.71)	6 (4': 103.3)	5 (3/2' 72.88)
6 = Kaempferol	3 (4': 54.7)		5 (3: 102.3)		5 (2': 107.2)	

4) The oxidation peaks in the voltammograms correlate with an oxidation of 3-OH group referring to our *ETE* calculations in water. In literature often 4'-OH group has been found to be oxidised first [16,20,21]. Further peaks from myricetin, isorhamnetin and kaempferol were not specified. Only for fisetin a rearrangement was taken in consideration that creates a new oxidisable species for a second oxidation peak according to Markovic et al. [21].

5) Concerning the order of peak potentials ($E_{\text{pl}}^{\text{ox}}$) of flavonols the experimental trend is not reflected in the order of *ETE* values, because fisetin has the lowest value and myricetin the highest one (Table 3). Comparing the order according to the total *SPLET* mechanism (minimum of $PA + ETE$) with the order of $E_{\text{pl}}^{\text{ox}}$, there is no significant trend, as fisetin and quercetin changed their order (Table 4). The minimum of $PA + ETE$ is characteristic for 3-OH group, except myricetin and fisetin, where it is at 4'-OH group. Considering the anion site (4'-OH group) for entering the *SPLET* mechanism, the deprotonated site of each molecule is preferred for electron transfer. Therefore, the order of $E_{\text{pl}}^{\text{ox}}$ matches with the resulting order of *SPLET* from the anion site: myricetin < quercetin < isorhamnetin < fisetin < morin < kaempferol as opposed to *SPLET* values: myricetin < fisetin < quercetin < isorhamnetin < kaempferol < morin. Since the calculated values are very similar to each other and the accuracy of the method most likely is well above 1 kcal/mol, the flavonols can be sorted into groups only (see Figure 4). This would allow assigning a special role to myricetin with the lowest value in the calculations and the oxidation potential. Quercetin, isorhamnetin and fisetin belong to a second group. They do not differ in their *SPLET* values and their oxidation potentials are nearly the same. Morin and kaempferol determine a third group (Table 4, *SPLET* Ref. [15] anion site).

In conclusion, the high antioxidant potency of selected flavonols was investigated and an oxidation potential order of these molecules was successfully established. For all flavonols the first deprotonated OH-group and their radicals were discussed. A comparison of the order of $E_{\text{pl}}^{\text{ox}}$ and *SPLET* anion site was conducted. Further studies may include the coupling of an electrochemistry measuring cell and mass spectrometry (MS) to determine the reaction mechanisms and relevant radicals. On the computational side an extension of the explicit solvation shell model could be expected to improve the agreement with the experiment.

Acknowledgements

Financial support by *Deutsche Krebshilfe* (Grant Number: 107821) and *BMBF* (Grant Number: 031A123) is gratefully acknowledged.

References

- [1] K. Herrmann, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **1973**, 75, 499–504.
- [2] B. Watzl, C. Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, Hippokrates Verlag, Stuttgart **1995**.
- [3] B. Watzl, G. Rechkemmer, *Ernährungs-Umschau* **2001**, 48, 499–503.
- [4] C. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radical Biol. Med.* **1996**, 20, 933–956.
- [5] J. S. Wright, E. R. Johnson, G. A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1173–1183.
- [6] D. Amic, B. Lucic, G. Kovacevic, N. Trinajstić, *Mol. Divers.* **2009**, 13, 27–36.
- [7] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *Food Chem.* **2011**, 125, 288–306.
- [8] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108, 4916–4922.
- [9] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3078–3085.
- [10] G. C. Justino, A. J. S. C. Vieira, *J. Mol. Model.* **2010**, 16, 863–876.
- [11] M. Leopoldini, T. Marino, N. Russo, M. Toscano, *Theor. Chem. Acc.* **2004**, 111, 210–216.
- [12] E. Klein, V. Lukes, M. Ilcin, *Chem. Phys.* **2007**, 336, 51–57.
- [13] Z. Markovic, D. Milenkovic, J. Dorovic, J. M. Dimitric Markovic, V. Stepanic, B. Lucic, D. Amic, *Food Chemistry* **2012**, 134, 1754–1760.
- [14] G. Litwinienko, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 222–230.
- [15] D. Amic, V. Stepanic, B. Lucic, Z. Markovic, J. M. Dimitric Markovic, *J. Mol. Model.* **2013**, 19, 2593–2603.
- [16] P. Janeiro, A. M. O. Brett, *Electroanalysis* **2005**, 17, 733–738.
- [17] H. R. Zare, M. Namazian, N. Nasirizadeh, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 584, 77–83.
- [18] E. M. Maza, M. B. Moressi, H. Fernandez, M. A. Zon, *J. Electroanal. Chem.* **2012**, 675, 11–17.
- [19] K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zielinski, A. E. B. Soffers, I. M. C. M. Rietjens, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31, 869–881.
- [20] A. M. O. Brett, M. E. Ghica, *Electroanalysis* **2003**, 15, 1745–1750.
- [21] Z. S. Markovic, S. V. Mentus, J. M. Dimitric Markovic, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 14170–14179.
- [22] R. Sokolova, S. Ramesova, I. Degano, M. Hromadova, M. Gal, J. Zabka, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3433–3435.
- [23] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09*, Revision C.1, Gaussian Inc., Wallingford, CT **2009**.
- [24] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999–3093.

- [25] S. V. Jovanovic, S. Steenken, Y. Hara, M. G. Simic, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1996**, 2, 2497–2504.
- [26] A. S. Pannala, T. S. Chan, J. O'Brian, C. A. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 282, 1161–1168.
- [27] P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035–1042.
- [28] W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, in *Methods in Enzymology, Vol. 186, Oxygen Radicals in Biological Systems*, Part B (Eds: L. Packer, A. N. Glazer), Academic Press, San Diego **1990**, pp. 343–355.
- [29] R. Alvarez-Diduk, M. T. Ramirez-Silva, A. Galano, A. Mer-koci, *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 12347–12359.
- [30] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13, 572–584.
- [31] D. Zhang, L. Xie, G. Jia, S. Cai, B. Ji, Y. Liu, W. Wu, F. Zhou, A. Wang, L. Chu, Y. Wei, J. Liu, F. Gao, *European J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4548–4558.

Received: December 16, 2013

Accepted: February 13, 2014

Published online: April 3, 2014

Publikation II

Full Paper *Electroanalysis*, 2015, **27**, in press

Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS

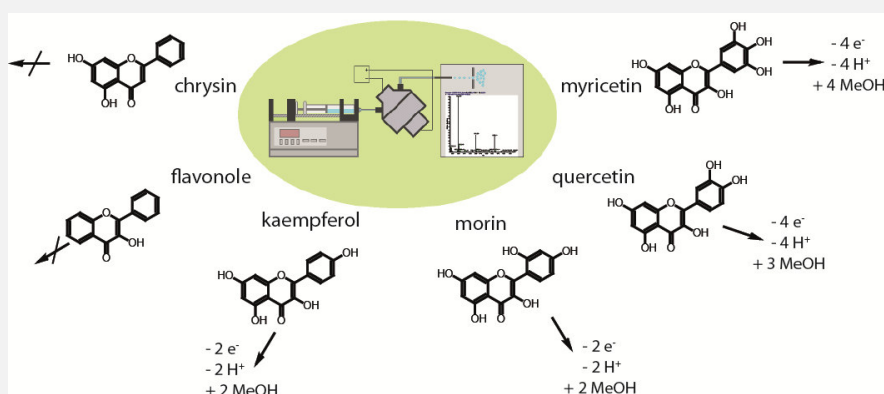
Sina Kummer (70%), Dr. Wolfgang Ruth (20%), Prof. Dr. Udo Kragl (10%)

Received: October 26, 2015, Accepted: November 24, 2015

DOI: 10.1002/elan.201501055

Table of Contents

The oxidation of chrysin, flavonol kaempferol, morin, quercetin and myricetin in methanol was performed in an electrochemical flow cell. This flow cell was coupled online with electrospray ionisation mass spectrometry to identify the possible oxidation products. An oxidation mechanism was predicted and the redox activity explains the number of observed multiple methoxylation. Moreover, we identified a second oxidation of the formed oxidation products of quercetin and myricetin for the first time.



Contribution (70%)

I wrote the manuscript, performed and evaluated all experiments and proposed the oxidation mechanisms. Dr. W. Ruth recorded the mass spectrometric data. Prof. Dr. U. Kragl revised the manuscript through final corrections.

Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS

Sina Kummer,^[a] Wolfgang Ruth,^[a] and Udo Kragl^{*[a]}

Abstract: Flavonols, a class of flavonoids, are jointly responsible for antioxidant activities as free radical acceptors in flowers, fruits and vegetables. Due to their electroactive behaviour, the oxidation of chrysin, flavonol, kaempferol, morin, quercetin and myricetin in methanol was performed in an electrochemical flow cell with glassy carbon as the working electrode. This flow cell was coupled online with electrospray ionisation mass spectrometry to identify the possible oxidation products. Based on

these experiments, it was concluded that when certain structural requirements are present, the initial electrode reaction of flavonols involves an electron delivery electrochemical step followed by a chemical step via methanol addition. The redox activity of the selected species explains the number of observed multiple methoxylation. Moreover, we identified a second two-electron, two-proton oxidation of the formed oxidation products of quercetin and myricetin for the first time.

Keywords: Antioxidants • Electrochemistry • Mass spectrometry • Reaction mechanisms • Voltammetry

1 Introduction

The combination of an electrochemical flow cell (EC) coupled online with electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) is an excellent tool for mechanistic electrochemical studies and for the identification of the generated short-lived products. Introducing EC/ESI-MS over 20 years ago [1], the development of modern techniques and instruments has led to analytical methods with increased sensitivity, speed and accuracy. More recently, a number of studies have investigated important metabolic oxidation reactions using EC/ESI-MS [2–9]. Using electrospray as a mild ionisation method that generates little or no fragmentation, the non-volatile, polar, thermally labile and, especially, high molecular weight analytes can be transferred from solution into the gas phase for mass analysis. Moreover, no heating of the solvent is required, and a wider variety of solvent systems can be used. The coupling facilitates the identification of electrochemically generated products present in small sample volumes and allows the detection of unstable products when short transfer capillaries are used between the electrochemical cell and the mass spectrometer. EC/ESI-MS is a suitable tool to investigate the oxidative behaviour of many redox active substances, such as flavonoids, that possess short-lived oxidation products and intermediates undergoing follow-up reactions in activated states.

Flavonols, a class of flavonoids, are present in flowers, fruits and vegetables and are jointly responsible for antioxidant activity as free radical acceptors [10–13]. They consist of two benzene rings (A and B) linked by a pyrane ring (C), which is characterised by a hydroxyl group at the C₃ position and by a C₂–C₃ double bond in ring C. The variable amounts and positions of hydroxyl groups in the backbone result in many possible naturally

occurring flavonol aglycones. Selected species are shown in Fig. 1.

These substances can be studied by electrochemical methods as they easily undergo oxidation, expressed by their low oxidation potentials. In a recent publication, we compared different flavonols using cyclic and differential pulse voltammetry. Based on theoretical and mechanistic considerations, as well as structural properties, we ranked these compounds according to their ease of oxidation [14]. EC/ESI-MS offers a unique tool to verify the species postulated in the previous study. In the EC, the substances can be nearly completely converted using a large working electrode surface area and low flow rates to achieve a high conversion efficiency. However, the oxidised species should be rapidly transported to the mass spectrometer to detect the short-lived intermediates that are generated, thus minimising the number of signals in the mass spectrum. Low flow rates lead to a longer residence time of the substances in the flow cell: this enables the occurrence of follow-up reactions of the oxidised species, limiting the detection of short-lived intermediates, despite the high sensitivity of MS. Although, an initial indication of the stability of oxidised products as a function of the electrode potential can be obtained. In addition, MS provides structural information for reactants and allows the identification of reactive intermediates.

The powerful EC/ESI-MS method was used to study the oxidation pathways for several flavonols and to identify short-lived intermediates. The first electrochemical

[a] S. Kummer, W. Ruth, U. Kragl
University of Rostock, Institute of Chemistry, D-18059
Rostock, Germany
*e-mail: udo.kragl@uni-rostock.de

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201501055>.

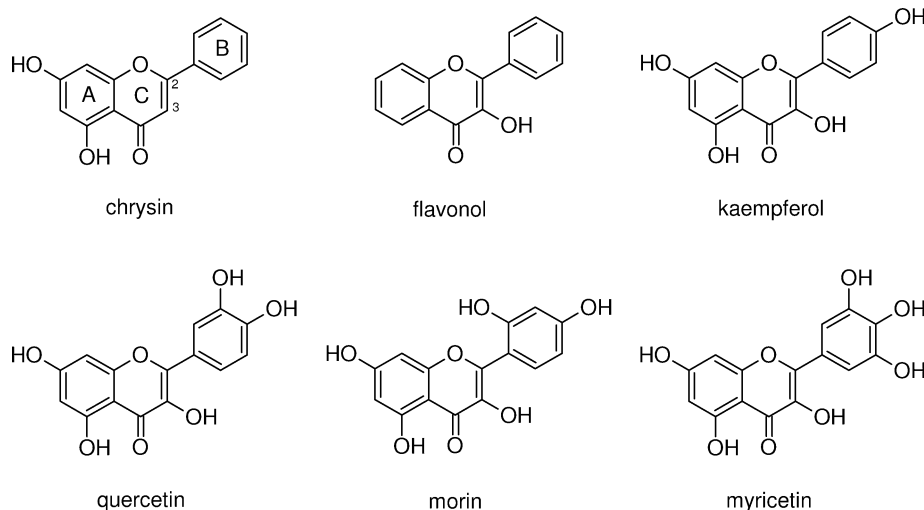


Fig. 1. Chemical structures of selected species examined in this study.

step and the subsequent chemical step in methanol were outlined. Moreover, we were able to distinguish between the major and minor oxidation products. Certain structural features are required to initiate the oxidation of selected flavonols. Therefore, the order in which multiple methoxylations occur for the second chemical step will be given, considering that the number of methanol additions depends on the redox activity of the selected flavonols.

2 Experimental

Chemicals. Chrysin, flavonol (3-hydroxyflavone), kaempferol, morin hydrate, anhydrous quercetin and myricetin were received from Sigma-Aldrich. Methanol, methanol with 0.1 % formic acid, water with 0.1 % formic acid, ethanol and formic acid were obtained from Fluka Analytical. All chemicals were obtained in the highest available purity and were used as received.

Sample Preparation. For preliminary investigations, a 20 μM quercetin solution was prepared in 60 % methanol and 40 % water with 0.1 % formic acid giving a pH value of pH 3.5 of the solution. The pH measurements were examined with a pH 3210 pH-meter from WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim, Germany), using a pH glass electrode model IJ44C and calibrated with technical buffer from WTW.

Further investigations of 20 μM quercetin were performed in methanol with 0.1 % formic acid or ethanol with 0.1 % formic acid due to the presence of fewer oxidation products compared with water/methanol mixtures. Therefore, the subsequent experiments were performed in methanol with 0.1 % formic acid. Measurements of pH values are only defined for aqueous solutions; however, methanol behaves as a water-like solvent and can autodissociate that we assume slightly acidic conditions with 0.1 % formic acid.

All flavonoid standards reached a final concentration of 20 μM , except for the sample of 100 μM flavonol due

to ionisation and detection problems in the mass spectrometer at lower concentrations.

Experimental setup. Voltammetry measurements were performed with a potentiostat/galvanostat PalmSens Electrochemical Sensor with PSTrace 4.5 software. Cyclic voltammetry (CV) measurements were done in a 5 mL batch cell with a glassy carbon electrode (Antec Leyden BV, Zoeterwoude, Netherlands) with 8 mm in diameter as the working electrode. A HyREF (Antec Leyden BV) was used as the reference electrode [$E_{\text{HyREF}}(\text{mV}) = E_{\text{Ag/AgCl}}(\text{mV}) - 328 + 29.9 \text{ pH}$] and platinum wire was used as the counter electrode.

The commercial electrochemical thin-layer flow cell ReactorCell™ from Antec Leyden BV was used for hydrodynamic experiments and consisted of three electrodes: glassy carbon as the working electrode, HyREF as the reference electrode and the inlet block made of conductive material as the counter electrode. A 50 μm spacer between the working electrode and the counter electrode was used to define the flow channel, and resulted in a dead volume in the flow cell of 0.7 μL . Due to the spacer the accessible area of the working electrode is minimised to approximately 15 mm^2 . The surface of the working electrode was polished with 1 μm diamond slurry (Antec Leyden BV) and was washed with distilled water prior to every experiment. Off-line hydrodynamic experiments were done with a Razel R99-E syringe pump (Razel Scientific Instruments, Saint Albans, United States).

Mass spectrometric conditions. The mass spectrometry experiments were performed with an LTQ Linear Ion Trap Mass Spectrometer from Thermo Finnigan (Thermo Scientific Inc., Eggenstein, Germany) with electrospray ionisation and XCalibur™ 2.2 software. Purified nitrogen was used as the sheath gas. The negative ESI mode was used with an ion spray voltage of -2.2 kV (-2.0 kV for flavonol). Scans were performed in the m/z 50–2000 mass range. The mass spectrometer was tuned with the respec-

tive flavonoid at the beginning of each measurement. The capillary from the flow cell to the mass spectrometer was 16.5 cm long and had an inner diameter of 0.01 inches, resulting in a response time of approximately 2–3 minutes, depending on the flow rate. The flow rate varied between 2 and 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ subordinated by the sample to obtain the optimal conditions for ionisation and detection in the mass spectrometer. The syringe infusion pump on the front panel of the mass spectrometer was used to feed the solution into the flow cell in on-line hydrodynamic experiments.

3 Results and Discussion

3.1 Preliminary Investigation

First, we selected the optimal conditions for coupling the EC with ESI-MS to ensure a high conversion efficiency in the flow cell and to ensure adequate conditions for the mass spectrometer. The addition of a supporting electrolyte to the sample solution would increase the conductivity and decrease the ohmic potential drop; however, initial experiments with ammonium formate and formic acid as supporting electrolytes caused congestion in the mass spectrometer. Moreover, the influence of the pH value must be considered during the oxidation of flavonols, because they show different oxidation products under acidic and basic conditions [15–20]. Hence, we used formic acid to guarantee the desired conductivity in the flow cell and to fulfil the requirements for flow in the mass spectrometer. Therefore, initial studies were performed on 20 μM quercetin in a solution consisting of 60% methanol and 40% water with 0.1% formic acid (pH 3.5). The addition of methanol or ethanol is required due to the limited solubility of the flavonols in water. To identify the electro-

chemical behaviour and to determine the oxidation potential of quercetin, a CV was performed in a 5 mL batch cell, indicating an oxidation potential at 0.18 V versus the HyREF reference electrode (Supplementary Fig. S1). On the cathode, reduction of protons to molecular hydrogen takes place. Offline hydrodynamic CVs with the Reactor-Cell™ at different flow rates (10–100 $\mu\text{L}/\text{min}$) were performed to characterise the flow cell (Supplementary Fig. S2). An oxidation of 20 μM quercetin begins at 0.3 V due to the ohmic potential drop in the cell. A high conversion efficiency is achieved at low flow rates, while higher flow rates cause inefficient conversion but a faster detection of short-lived products. However, an optimal flow rate must be selected to obtain stable conditions for the mass spectrometer. The best results were obtained at low flow rates (about 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) because they favour ionisation and detection in the mass spectrometer.

By coupling the flow cell with the mass spectrometer and applying a potential of 0.6 V, we obtained many different oxidation products at the flow rate of 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. These products were not present under open circuit conditions of the flow cell (Supplementary Fig. S3). The obtained mass spectrum at a potential of 0.6 V is shown in Fig. 2. A signal at m/z 301 represents the molecular mass in the negative scan mode. The main products are obtained for m/z 299, 317, 325, 331, 339, 349 and 363. The structures of the formed reaction products are shown on the right-hand side of Fig. 2. M/z 325 and 339 were not identified.

Due to the formation of many oxidation products in the methanol/water solution, we performed the next set of experiments only in methanol with 0.1% formic acid at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ and obtained fewer oxidation products. The oxidation of 20 μM quercetin results in only three main oxidation products with m/z values of

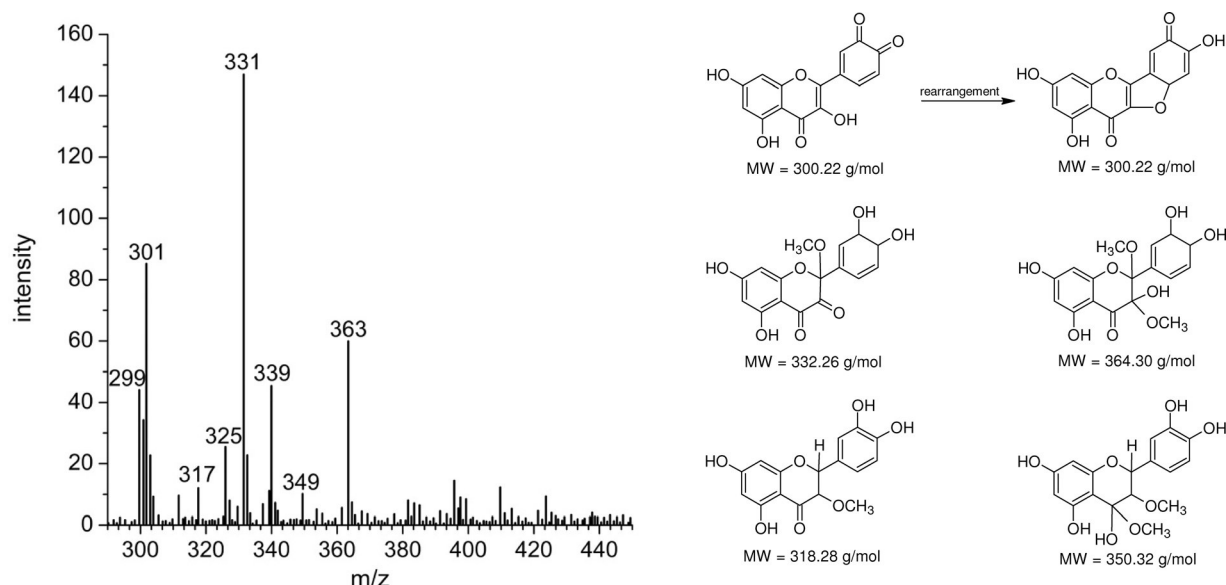


Fig. 2. Mass spectra of 20 μM quercetin in 60% methanol and 40% water with 0.1% formic acid at 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate in the negative ESI mode at a potential of 0.6 V and structures of the formed reaction products.

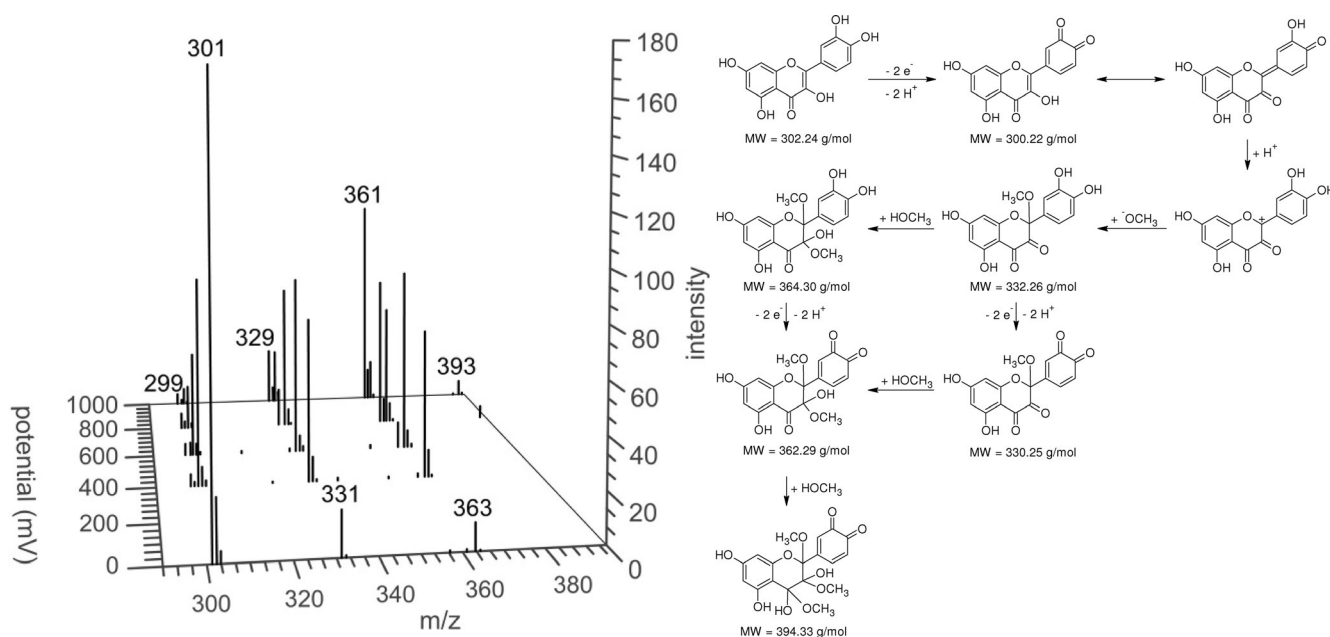


Fig. 3. Mass voltammogram of 20 μM quercetin in methanol with 0.1 % formic acid at an 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate in the negative ESI mode as a function of EC potential and the proposed oxidation mechanism.

299, 331 and 363 at low applied potential. Chronoamperometry data analysis shows a linear relationship between the current and the 1/square root of time at a potential of 0.4 V, indicating a diffusion controlled electrolysis. A corrosion-passivation process at the electrode can be neglected (Supplementary Fig. S4).

The influence of the potential on the mass spectra is shown in Fig. 3. At the potential of 0 V, the signals at m/z 331 and 363 are caused by the ESI process, but the signals increase with applied potential justifying them as oxidation products. At higher potentials, the signals at m/z 329, 361 and 393 appear.

Based on these experiments, it is concluded that the initial electrode reaction involves a two-electron, two-proton step for quercetin to form an *ortho*-quinone [12,18,19]. This electrochemically active and unstable species can undergo intramolecular rearrangements or addition reactions with nucleophiles [21]. Hence, methanol addition is accomplished. At high applied potentials, the oxidation products can undergo a further two-proton, two-electron step to become oxidised again. This finding has not been previously reported in the literature. These species are represented by the signals at the m/z values of 329 and 361 in the mass spectra. Finally, a third methanol addition occurs, but the amount of the formed product is very small.

For comparison, experiments were also performed in ethanol with 0.1 % formic acid. Similar to methanol, the oxidation products is an *ortho*-quinone (m/z 299) formed by a two-electron, two-proton step, followed by ethanol addition (m/z 345 and 391) and further oxidation of the ethanol adducts (m/z 343 and 389) (Supplementary Fig. S5).

Consequently, the experiments described below were performed in methanol with 0.1 % formic acid, yielding fewer oxidation products for investigation and comparison of the different electroactive behaviours and activities of selected flavonols.

3.2 EC/ESI-MS of Flavonols

Chrysin. Chrysin represents the simplest backbone of the selected species, as shown in Fig. 1. The hydroxyl group at the C_3 position adjacent to the C_2 - C_3 double bond in ring C that is essential for high electroactive behaviour is absent in chrysin. Thus, the selected potential range is insufficient to oxidise chrysin under these experimental conditions. Cyclic and mass voltammograms in methanol with 0.1 % formic acid as a function of EC potential show no oxidation products (Supplementary Fig. S6 and S7). The oxidation of the two hydroxyl groups on ring A starts at higher potentials [16] and cannot be observed in these voltammograms. However, the mass spectrum only shows a signal at m/z 253 for the molecular mass in the negative scan mode and at m/z 506 for the molecular adduct. This highlights the precision of the obtained measurements using a combination of the flow cell and the mass spectrometer.

Flavonol. Flavonol displays the basic structure of this class of substances, consisting of a hydroxyl group at the C_3 position and a C_2 - C_3 double bond in ring C to fulfil the essential conditions for high electroactive behaviour. This is indicated in the CV data shown in Supplementary Fig. S6. Unfortunately, the mass voltammogram in Fig. 4A shows only three signals at a flow rate of 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Two different molecular sodium adducts at m/z 497

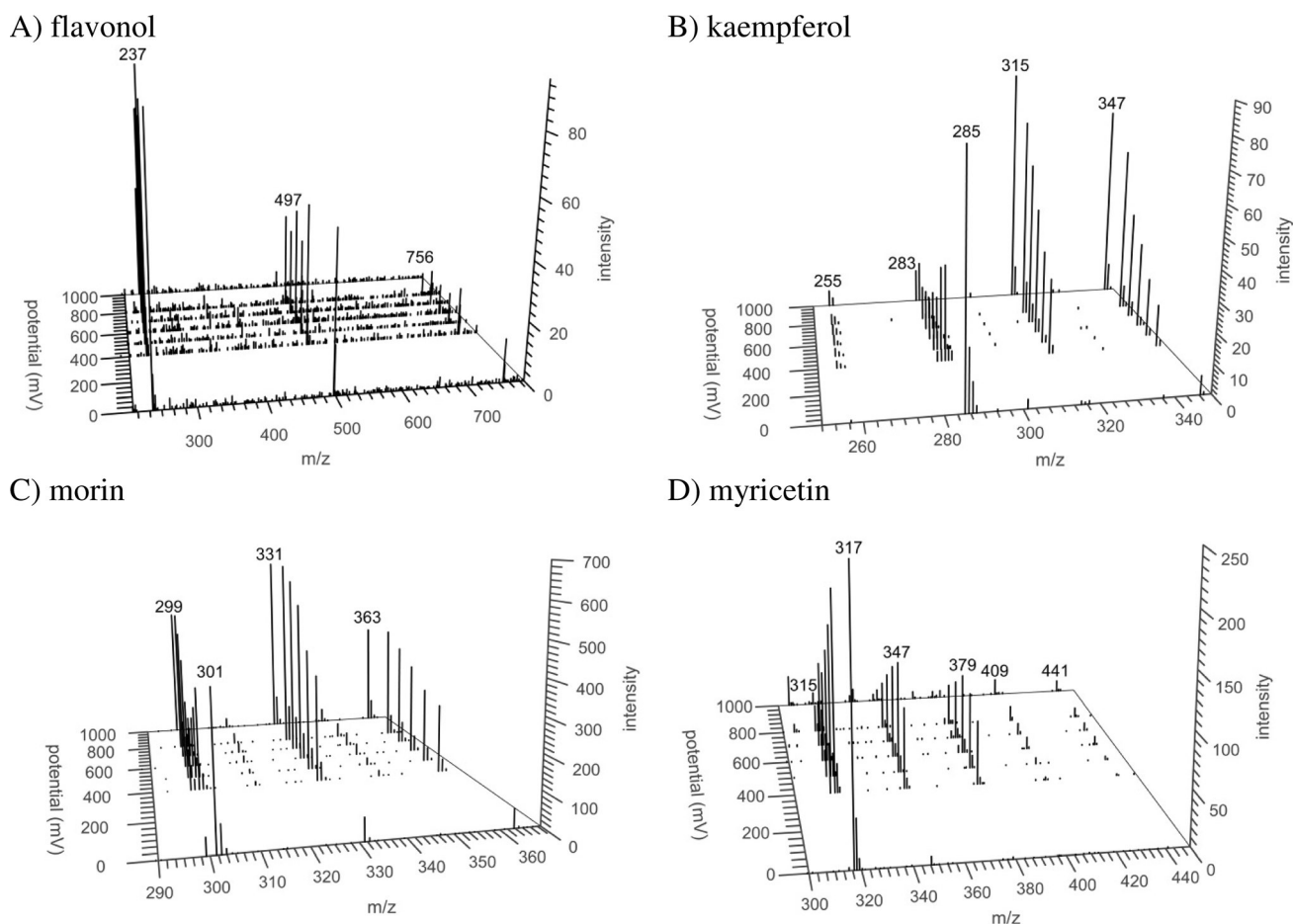


Fig. 4. Mass voltammograms of A) 100 μM flavonol (15 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate), B) 20 μM kaempferol (10 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate), C) 20 μM morin (8 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate) and D) 20 μM myricetin (10 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate) in methanol with 0.1 % formic acid.

and m/z 756 are present in addition to a signal at m/z 237 for the molecule mass in negative scan mode.

The concentration is five-fold higher than that for the other compounds (100 μM flavonol) because ionisation and detection of the generated species in the mass spectrometer were otherwise too pure. Hence, no oxidation products were observed in the flavonol mass voltammograms.

Kaempferol. Kaempferol possesses a lone hydroxyl group at the 4' position of ring B, making this molecule less redox-active than quercetin with its catechol unit at ring B (Supplementary Fig. S6, [14]). However, the redox-active behaviour is high compared with flavonol, as seen by the number of oxidation products in the mass voltammogram at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Fig. 4B). A two-fold methoxylation is clearly visible as major oxidation products (m/z 315 and 347) by a previous two-electron, two-proton delivery (Fig. 5B). An oxidation mechanism was introduced by Jorgensen *et al.* in which the initial oxidation produces a transient radical cation that rapidly loses a proton to form a neutral phenoxyl radical. The B-ring radical is stabilised by intramolecular hydrogen bonding, and a loss of a proton from 3-OH results in an anion radical. A subsequent one-electron oxidation yields a reactive

intermediate, encouraging the methanol addition to act as the nucleophil [22]. A subsequent oxidation of the methoxylated products from kaempferol could not be identified, revealing the lower redox-active behaviour of kaempferol compared with quercetin. A further minor oxidation product at m/z 255 was found, but was not identified in greater detail. We were interested in the methoxylated products and this minor oxidation product seems to be a splitting product.

Morin. Morin exhibits two hydroxyl groups in ring B arranged in the *meta*-position to each other, which is less favourable for the electroactive behaviour. The electroactive behaviour is slightly decreased compared with quercetin (Supplementary Fig. S6, [14]). However, at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$, three major and two minor oxidation products are observed at m/z 299, 331, and 363 and at m/z 315 and 347, respectively (Fig. 4C). Mendoza-Wilson *et al.* established an oxidation mechanism for morin with several tautomeric forms, describing the first oxidation site at the 3-OH group followed by an oxidation at the 2' position to form a quinone [23]. Then, methanol addition is performed (Fig. 5C). Again, no further oxidation of the methanol products was found.

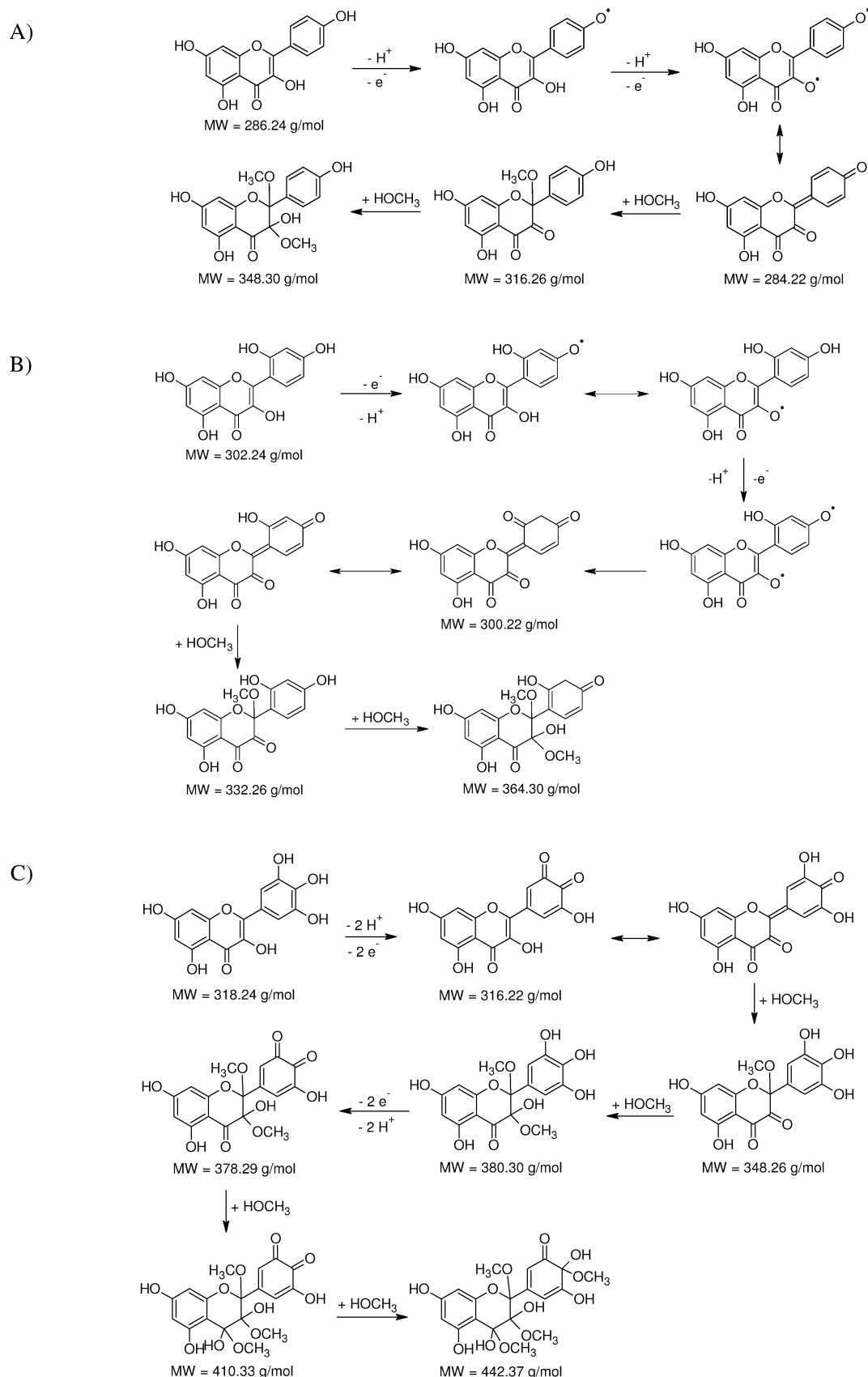


Fig. 5. Proposed oxidation mechanisms of A) kaempferol, B) morin and C) myricetin starting with a two-electron, two-proton step followed by a different number of methanol additions. Methanol showed a second two-proton, two-electron oxidation.

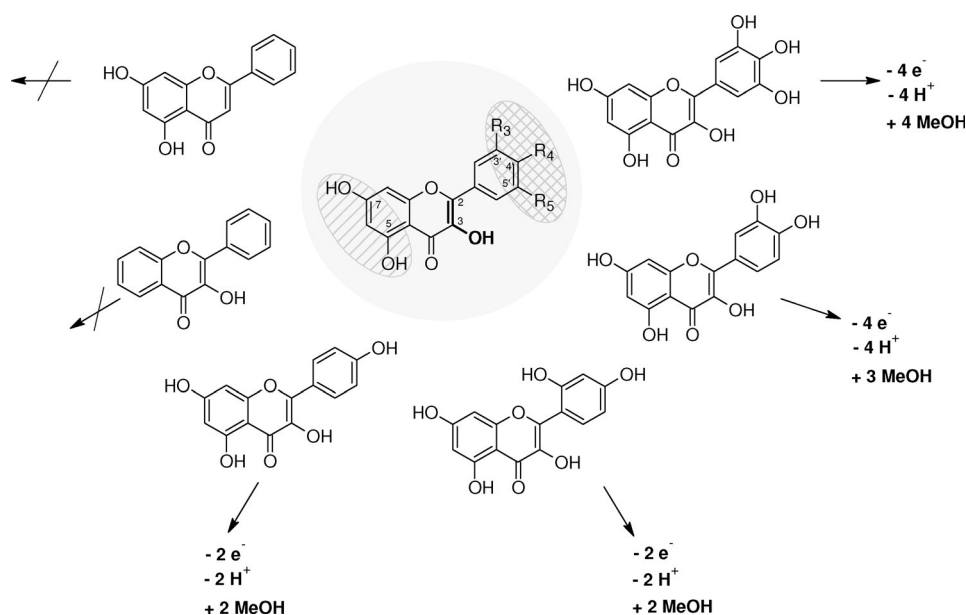


Fig. 6. Summary of the electroactive behaviours of selected species during oxidation in methanol with 0.1 % formic acid. The C₅- and C₇-OH groups have no influence, while a C₂-C₃ double bond and a 3-OH group are required, and the presence of additional OH groups in ring B increases the electroactive behaviour.

Myricetin. Inasmuch as myricetin also possesses a catechol unit (actually, a pyrogallol unit) at ring B similar to quercetin, it exhibits high electroactive behaviour. Its oxidation potential is lower than that of quercetin (Supplementary Fig. S6, [14]), and myricetin yielded two major and three minor oxidation products at *m/z* 347 and 379 and at *m/z* 315, 377, 409 and 441, respectively, at higher applied potentials and at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Fig. 4D). Myricetin also forms a quinone in the first two-electron, two-proton oxidation step due to the 4'- and 3'-OH groups. This intermediate undergoes tautomerisation, and methanol is then added. Only the oxidation product with two methoxylated positions (*m/z* 379) undergoes a second two-electron, two-proton step with two further methanol additions. This mechanism is presented in Fig. 5D. To the best of our knowledge, these investigations have not been previously reported in the literature.

4 Conclusion

Many intermediates and products for the oxidation of a structurally broad range of flavonols have been identified. The sites prone to oxidation were determined by varying the oxidation potential. The coupling of an EC with highly sensitive mass spectrometry allowed the identification of the particular structural conditions. Proximity to the C₂-C₃ double bond and the 3-OH group in ring C, along with additional OH groups in the backbone, are essential for high electroactive behaviour. Therefore, chrysin and flavonol showed no oxidation products. Furthermore, the C₅- and C₇-OH groups have no influence

on the electroactive behaviour under these experimental conditions.

An OH group in ring B (kaempferol) or a second OH group in the *meta*-position in ring B (morin) result in few but distinctive oxidation products obtained through a two-electron, two-proton step and two methanol additions. Two OH groups in the *ortho*-position (quercetin) give rise to a four-electron, four-proton step and three methanol additions, whereas the three OH groups at ring B (myricetin) further increase the electroactive behaviour with a four-electron, four-proton step and four methanol additions. A summary is provided in Fig. 6.

Additionally, the order of the multiple methoxylations for the second chemical step can be provided. The first methanol addition occurs at the C₂ position at ring C followed by the C₃ position for the second methoxylation and at the C₄ position for the third methoxylation. It was clearly shown that the number of methanol additions depends on the redox activity of the flavonols. For the most easily oxidised compound myricetin, up to four methanol additions are possible. Moreover, we identified a second two-electron, two-proton oxidation of the formed oxidation products of quercetin and myricetin for the first time.

Acknowledgements

Financial support by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF-Bundesministerium für Bildung und Forschung) (Grant Number 031A123) is gratefully acknowledged.

References

- [1] F. Zhou, G. J. Van Berkel, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3643–3649.
- [2] N. A. Mautjana, J. Estes, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1959–1967.
- [3] N. A. Mautjana, J. Estes, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2501–2508.
- [4] A. Baumann, U. Karst, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 715–731.
- [5] F. Pitterl, J.-P. Chervet, H. Oberacher, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1203–1215.
- [6] T. Hoffmann, D. Hofmann, E. Klumpp, S. Küppers, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *399*, 1859–1868.
- [7] R. Erb, S. Plattner, F. Pitterl, H.-J. Brouwer, H. Oberacher, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 614–621.
- [8] R. Arakawa, M. Yamaguchi, H. Hotta, T. Osakai, T. Kimoto, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1228–1236.
- [9] C. F. Bökman, C. Zettersten, P. J. Sjöberg, L. Nyholm, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2017–2024.
- [10] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956.
- [11] P.-G. Pietta, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035–1042.
- [12] A. S. Pannala, T. S. Chan, P. J. O'Brien, C. A. Rice-Evans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 1161–1168.
- [13] M. Musialik, R. Kuzmich, T. S. Pawlowski, G. Litwinienko, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2699–2709.
- [14] S. Kummer, W. Ruth, O. Kühn, U. Kragl, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 910–918.
- [15] K. Lemanska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zielinski, A. E. Soffers, I. M. Rietjens, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 869–881.
- [16] P. Janeiro, O. Corduneanu, A. M. Oliveira Brett, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1059–1064.
- [17] R. Sokolova, S. Ramesova, I. Degano, M. Hromadova, M. Gal, J. Zabka, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3433–3435.
- [18] A. M. O. Brett, M.-E. Ghica, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1745–1750.
- [19] H. R. Zare, M. Namazian, N. Nasirizadeh, *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *584*, 77–83.
- [20] P. Janeiro, A. M. O. Brett, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 733–738.
- [21] A. K. Timbola, C. D. d. Souza, C. Giacomelli, A. Spinelli, *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 139–148.
- [22] L. V. Jorgensen, C. Cornett, U. Justesen, L. H. Skibsted, L. O. Dragsted, *Free Rad. Res.* **1998**, *29*, 339–350.
- [23] A. M. Mendoza-Wilson, H. Santacruz-Ortega, R. R. Balandran-Quintana, *J. Mol. Struct.* **2011**, *995*, 134–141.

Received: October 26, 2015
Accepted: November 24, 2015
Published online: ■ ■ ■, 0000

Publikation III

Full Paper *Electroanalysis*, in press

Electrochemical Initiated C-N Coupling of 3-Methylcatechol and *n*-Hexylamine in a Flow Cell Monitored with ESI-MS

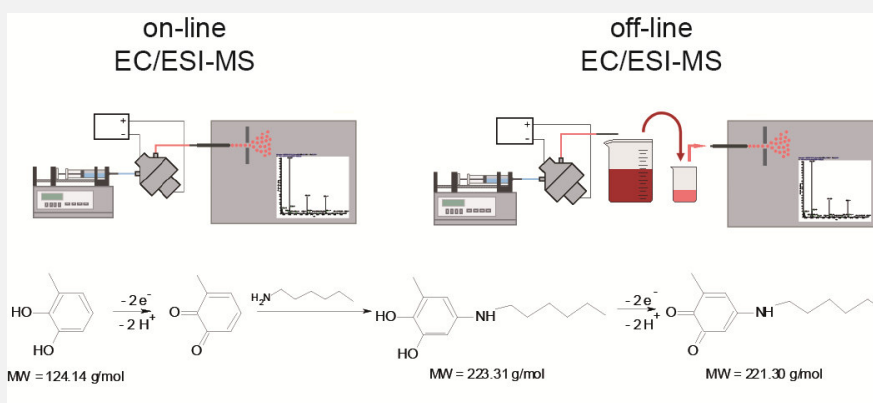
Sina Kummer (70%), Dr. Wolfgang Ruth (20%), Prof. Dr. Udo Kragl (10%)

Received: January 21, 2016, Accepted: March 3, 2016

DOI: 10.1002/elan.201600035

Table of Contents

The electrochemical initiated heterocoupling of 3-methylcatechol and *n*-hexylamine was investigated. The oxidation of 3-methylcatechol was performed in an electrochemical flow cell. The quinone intermediate undergoes a C-N coupling reaction in the presence of an amine (Michael addition). Acidic and basic conditions, as well as different substrate ratios were probed. This flow cell was coupled online with electrospray ionisation mass spectrometry to identify the possible coupling products. Higher substrate concentrations were performed off-line as first scale-up experiments in a two-step procedure.



Contribution (70%)

I wrote the manuscript, performed and evaluated all experiments and proposed the reaction mechanisms. Dr. W. Ruth recorded the mass spectrometric data. Prof. Dr. U. Kragl revised the manuscript through final corrections.

Electrochemical Initiated C-N Coupling of 3-Methylcatechol and *n*-Hexylamine in a Flow Cell Monitored with ESI-MS

Sina Kummer,^[a] Wolfgang Ruth,^[a] Udo Kragl^{*,[a]}

^[a] Institute of Chemistry, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

* e-mail: udo.kragl@uni-rostock.de

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Accepted: ((will be filled in by the editorial staff))

Abstract

The electrochemical initiated heterocoupling of 3-methylcatechol and *n*-hexylamine was investigated. The oxidation of 3-methylcatechol was performed in an electrochemical flow cell with glassy carbon as the working electrode. As a result, the two-electron, two-proton oxidised quinone intermediate undergoes a C-N coupling reaction in the presence of an amine (Michael addition). This mono coupling product can undergo a second two-electron, two-proton oxidation depending on acidic or basic conditions and substrate ratios. This flow cell was coupled on-line with electrospray ionisation mass spectrometry to identify the possible coupling products. Higher substrate concentrations were performed off-line as first scale-up experiments in a two-step procedure.

Keywords: Electrochemistry, Mass spectrometry, C-N heterocoupling

DOI: 10.1002/elan.((will be filled in by the editorial staff))

1. Introduction

The combination of electrochemistry with mass spectrometry allows mechanistic studies of important metabolic oxidation reactions in various areas of research, for example the metabolism investigation of nucleosides [1-4], amino acids [5, 6], pharmaceuticals, especially the oxidation behaviour of drugs [7, 8], or the oxidation processes of xenobiotics in the environment [9]. By combining an electrochemical flow cell (EC) with the electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS), the coupling facilitates in principle the determination of an oxidation pathway for many redox active substances. For example, in our previous study we investigated the oxidation pathway of a structurally broad range of flavonols [10]. Since many oxidation reactions are enzymatic and occur with various mechanisms, it is also possible to study redox reactions of biomolecules with the help of EC/ESI-MS by mimicking the metabolic reactions and increase the understanding of the mechanism pathway. EC/ESI-MS is an excellent tool to directly monitor reactants, short-lived intermediates and products of the electrochemical reaction as a function of the electrode potential. Moreover, it provides structural information about reactants, intermediates and products.

Laccases catalyse the oxidation of phenolic hydroxyl groups to give phenoxy radicals. They are abstracting

hydrogen with the help of molecular oxygen as an electron acceptor to form water. These radicals can undergo a broad variety of reactions. Despite the immense substrate spectrum of laccases, the main emphasis in this work is focused on the oxidation of *ortho*-hydroxylated phenols, where the formed quinones endure heteromolecular coupling afterwards. The aim of this work is to demonstrate the potential of an electrochemical system to mimic enzymatic oxidation metabolisms. The laccase-initiated oxidative C-N coupling of 3-methylcatechol with *n*-hexylamine is well described in the literature [11, 12]. One disadvantage is the inactivation of laccases in high methanol concentrations, as methanol is required to dissolve the substrates (*n*-hexylamine) in an aqueous reaction system. Moreover, the low solubility of the C-N coupling product in water is also predominant. The major advantage of the electrochemical initiated oxidation is the independence of the solvent, since pure methanol can be used for the reaction process to overcome the solubility problems of the substrates or products. In as much as the electrochemical oxidation is a mild synthetic route and the oxidation of catechol is known [13, 14], we are able to mimic the C-N coupling of a primary amine with the oxidation products of 3-methylcatechol. An important consideration is the metabolic stability of the products

and their identification *via* mass spectrometry. The EC/ESI-MS system is a purely instrumental and time-saving method in contrast to an enzyme route. Electrochemical reactions in a flow cell need lower substrate concentrations; hence the conversion is faster when using a large working electrode surface area. Enzyme catalysed reaction processes can last hours or days to get full conversion of the substrates and on-line tracking is difficult. Mostly, reaction products are analysed from the (final) batch solution after downstream processing of the analyts. In EC/ESI-MS results can be obtained in minutes. Therefore, EC/ESI-MS is a suitable tool to reveal the high potential of electrochemical initiated metabolism studies. Here, we compare the laccase-catalysed oxidation reaction [12] with the oxidation reactions simulated by electrochemistry. In the present study, we consider the C-N coupling under acidic and basic conditions and vary the substrate ratios. We will also increase the substrate concentrations to perform the first scale-up experiments.

2. Experimental

Chemicals. 3-Methylcatechol, *n*-hexylamine and methanol were received from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Acetic acid (glacial) was purchased from CHEMSOLUTE – Th.Geyer (Renningen, Germany). All chemicals were obtained in the highest available purity and were used as received.

Sample Preparation. All measurements were performed in methanol with varied amount of acetic acid to imitate acidic (0.1% acetic acid in methanol), slight acidic (0.01% acetic acid in methanol) or basic conditions (without acetic acid). Measurements of pH values are only defined for aqueous solutions; however, methanol behaves as a water-like solvent and can autodissociate that we assume (slight) acidic conditions with acetic acid (pKa value 4.76). No addition of acetic acid will cause basic conditions of the reaction mixture due to the strong alkaline nature of the amine (pKa value 10.56). This is quite a simplification, but on our previous experiments using laccase catalyzed heterocoupling where we used addition of acetic acid to control the reaction conditions [12] we used the same approach here to compare the obtained results. Moreover, different ratios of 3-methylcatechol (1) and *n*-hexylamine (2) were tested. The concentrations of the substrates in the reaction solutions were either 1 mM or 2 mM. A summary of all on-line measurements can be found in Table 1.

Experimental setup. Voltammetry measurements were performed with a potentiostat/galvanostat PalmSens Electrochemical Sensor with PSTrace 4.5 software

(PalmSens BV, Houten, Netherlands). Cyclic voltammetry (CV) measurements were done in a 5 mL batch cell with a glassy carbon electrode (Antec Leyden BV, Zoeterwoude, Netherlands) with 8 mm in diameter as the working electrode. A HyREF (Antec Leyden BV) was used as the reference electrode [E_{HyREF} (mV) = $E_{\text{Ag/AgCl}}$ (mV) -328+29.9 pH] and platinum wire was used as the counter electrode.

The commercial electrochemical thin-layer flow cell ReactorCell™ from Antec Leyden BV was used for on-line experiments and consisted of three electrodes: glassy carbon as the working electrode, HyREF as the reference electrode and the inlet block made of conductive material as the counter electrode. A 50 µm spacer between the working electrode and the counter electrode was used to define the flow channel, and resulted in a dead volume in the flow cell of 0.7 µL. Due to the spacer the accessible area of the working electrode is minimised to approximately 15 mm². The surface of the working electrode was polished with 1 µm diamond slurry (Antec Leyden BV) and was washed with distilled water prior to every experiment.

Mass spectrometric conditions. The mass spectrometry experiments were performed with an LTQ Linear Ion Trap Mass Spectrometer from Thermo Finnigan (Thermo Scientific Inc., Egelsbach, Germany) with electrospray ionisation and XCalibur™ 2.2 software. Purified nitrogen was used as the sheath gas. The mass spectrometric conditions for on-line EC/ESI-MS are summarised in Table 1. The negative ESI mode detects the catechol species, and with the positive ESI mode the amine species are observable. Scans were performed in the *m/z* 50-500 mass range. At the beginning we also tested the *m/z* 50-2000 mass range and no signals were recognized higher than *m/z* 500. The mass spectrometer was tuned with the respective substrate at the beginning of each measurement. The capillary from the flow cell to the mass spectrometer was 16.5 cm long and had an inner diameter of 0.01 inches, resulting in a response time of approximately 1-2 minutes, depending on the flow rate. The flow rate varied between 8 and 12 µL/min subordinated by the sample to obtain the optimal conditions for ionisation and detection in the mass spectrometer. Hence, the adjustment of sheath gas and spray voltage differ also because of this reason. The syringe infusion pump on the front panel of the mass spectrometer was used to feed the solution into the flow cell in on-line experiments.

Scale-up Experiments. Higher substrate concentrations were investigated in off-line experiments. First, the electrochemical initiated C-N coupling reaction was done in the thin-layer flow cell described above with

the help of a Razel R99-E syringe pump (Razel Scientific Instruments, Saint Albans, United States) with a 2 ml B-D Discardit II syringe (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). The flow rate was set at 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. After the flow cell the solution was collected and then diluted with methanol to an appropriate concentration for the mass spectrometer by reaching a final concentration of 1 mM for 3-methylcatechol. Finally, the diluted solutions were measured with ESI-MS by using the syringe infusion pump on the front panel of the mass spectrometer. A summary of all off-line measurements with different concentrations of 3-methylcatechol (1) and *n*-hexylamine (2) and the mass spectrometric conditions for ESI-MS can also be found in Table 1.

Table 1. Mass spectrometric conditions for on-line EC/ESI-MS and off-line ESI-MS.

	Solvent system	Substrate ratio	Flow rate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Sheath Gas [arb]	Spray voltage [kV]
on-line exp.	0.1% HOAc/MeOH	1 mM (1)	12	12	-2.00
	0.1% HOAc/MeOH	1 mM (1)	12	12	-2.00
		1 mM (2)	12	12	+2.00
	0.01% HOAc/MeOH	1 mM (1)	8	15	-2.50
		1 mM (2)	8	15	+2.50
	MeOH	1 mM (1)	8	15	-2.50
		1 mM (2)	8	15	+2.50
	0.01% HOAc/MeOH	1 mM (1)	8	15	-2.50
off-line exp.		2 mM (2)	8	15	+3.00
	0.01% HOAc/MeOH	1 mM (1)	8	15	-2.50
		2 mM (2)	8	15	+3.00
	0.1% HOAc/MeOH	10 mM (1)	8	15	-2.50
		20 mM (2)	8	15	+3.00
	0.12% HOAc/MeOH	10 mM (1)	8	15	-2.50
		20 mM (2)	8	15	+3.00
	0.6% HOAc/MeOH	50 mM (1)	8	15	-2.50
		100 mM (2)	8	15	+3.00

(1) 3-methylcatechol, (2) *n*-hexylamine

3. Results and Discussion

3.1. Oxidation of 1 mM 3-methylcatechol in 0.1% HOAc/MeOH

First, we verified the oxidation of 3-methylcatechol in methanol with 0.1% acetic acid in a batch cell. We observed a limiting current starting at 0.15 V *via* CV at a scan rate of 5 mV/s (Fig. 1, inset A). To maintain the conditions for the mass spectrometer a peak-shaped CV could not be obtained due to the low conductivity of the

solution. However, we also performed a CV with 0.15 M sodium acetate as supporting electrolyte to increase the conductivity and we attained an anodic peak at 0.275 V (Fig. 1, inset B), as also described by Nematollahi and Golabi [13]. The cathodic peak was observed at -0.06 V, but it shows a quasireversible charge transfer process.

Next experiments were performed on-line with ESI-MS to identify possible oxidation products of 3-methylcatechol. The mass voltammogram in the negative ESI mode as a function of EC potential is shown in Fig. 2A. A signal at m/z value 123 represents the molecular mass of 3-methylcatechol. The oxidation of 3-methylcatechol results in four main oxidation products with m/z values of 243, 245, 303 and 425. The oxidation products at the potential of 0 V are caused by the ESI process, but the signals increase with applied potential justifying them as oxidation products.

In as much as the current density should be constant and proportional to the reaction products at a given potential, chronoamperometry data analysis (data not shown) showed a linear relationship between the current and the 1/square root of time at a potential of 0.2 V, indicating a diffusion controlled electrolysis. A corrosion-passivation process at the electrode can be neglected at low applied potentials. At high applied potential (starting at 0.6 V) a deviation from linearity was observed due to the passivation of the electrode of possible formed polymerised products.

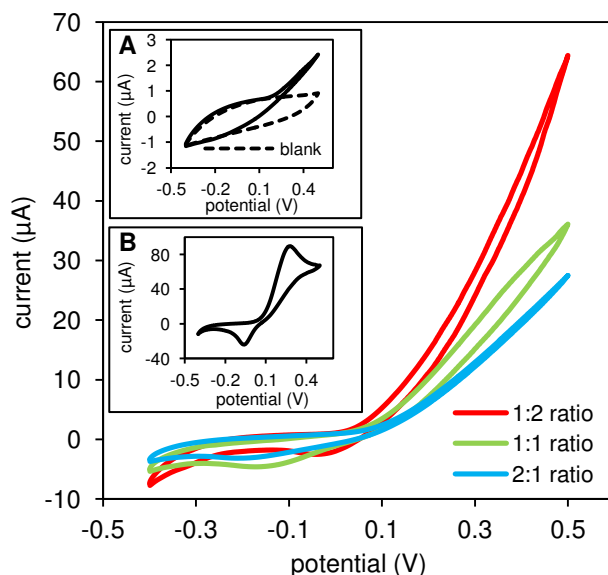


Fig. 1. CVs of 3-methylcatechol and *n*-hexylamine with different ratios in 0.01% HOAc/MeOH at a scan rate of 5 mV/s. Inset A: CV of 1 mM 3-methylcatechol in 0.1% HOAc/MeOH at a scan rate of 5 mV/s. Inset B: CV of 1 mM 3-methylcatechol in 0.1% HOAc/MeOH with 0.15M NaOAc as supporting electrolyte at a scan rate of 5 mV/s.

Based on these experiments, it is concluded that the initial electrode reaction involves a one-electron, one-proton step to form a semiquinone type intermediate. This electrochemically active and unstable species can undergo dimerisation (m/z 245) [15, 16]. On the one hand the formed dimer can be involved in an addition reaction with nucleophiles (Michael addition) by methanol, but this was detected only in traces (m/z 305). On the other hand, the dimer can further be oxidised by a two-electron, two-proton step (m/z 243) and methanol attachment is accomplished (m/z 303). This is the main oxidation product. On the cathode, reduction of protons to molecular hydrogen takes place. A reaction mechanism is presented in Fig. 3A. However, it has to be taken into account that isomeric compounds cannot be distinguished from each other.

3.2. C-N coupling under acidic and basic conditions

In as much as the oxidation of 3-methylcatechol takes place in on-line EC/ESI-MS, the next set of experiments investigates the C-N coupling of 3-methylcatechol with *n*-hexylamine, whereby the focus is now directed to best reaction conditions under an acidic or a basic environment for the characterisation of the Michael addition.

The voltammogram of 1 mM 3-methylcatechol and 1 mM *n*-hexylamine in 0.1% HOAc/MeOH indicates a higher limiting current (38 μ A, data not shown) than the oxidation of 3-methylcatechol itself (2.5 μ A, Fig. 1, insert A) at 0.5 V. On-line EC/ESI-MS with 0.1% HOAc/MeOH reveals the expected monoaminated product in low yields (m/z 220), but the dimer product (m/z 303) is still favoured (Fig. 2B) at increasing applied potential in negative ESI mode. Also, many by-products are formed. In the positive ESI mode m/z 224 increases with increasing potential, representing only the simple oxidised coupling product. We expected a four-electron, four-proton oxidised product, as it can be seen in the reaction mechanism in Fig. 3B. We assume that the environment is too acidic for *n*-hexylamine due to the reduced nucleophilicity of the more protonated (positively charged) amine in the acidic range with 17.5 mM acid in the solution. Unfortunately, in negative ESI mode the two-electron, two-proton oxidation product is not visible due to ionisation or detection circumstances. Therefore, we performed both ESI modes in the next experiments to clarify the oxidation mechanism in different environments. Chronoamperometry data analysis (data not shown) showed again deviations from the linear relationship between the current and the 1/square root of time at high potentials, indicating a

corrosion-passivation process at the electrode at high applied potentials.

To ensure slight acidic conditions, we tested the C-N coupling in 0.01% HOAc/MeOH, which corresponds to 1.75 mM acid in the solution. On-line EC/ESI-MS reveals the four-electron, four-proton oxidised monoaminated product in negative (m/z 220) and positive (m/z 222) ESI mode. Nearly the same amount of m/z 224 like m/z 222 was observed (Fig. 2C; Fig. 4 green solid lines). Moreover, we detected a small amount of diaminated coupling product in positive ESI mode (m/z 323).

Further, we investigated basic conditions by omitting acetic acid in the solution. Immediately, the reaction solution became red-coloured, which is indicative of the formation of quinonamines by air oxygen in the solution. Hence, no electrochemistry is necessary to get the desired coupling product. This is supported by MS measurements, which explain the formed coupling product still at the beginning of the data recording. Nevertheless as a trial, we applied 1 V and 1.2 V to increase the intensity of the coupling product and to decrease the intensity of 3-methylcatechol to investigate full conversion efficiency. The clearly main oxidation product is the desired monoaminated coupling product (Fig. 2D), but many byproducts are also formed. In positive ESI mode m/z 323 represents the diaminated coupling product. The two-electron, two-proton product with additional methanol attachment is found at m/z 254 and the four-electron, four-proton product with methanol addition at m/z 252. We presume the monoaminated dimer at m/z 442. The electrolysis of 3-methylcatechol in presence of *n*-hexylamine in methanol under basic and anaerobic conditions was not further investigated due to two reasons. Firstly, the experimental setup would be much more complicated. Secondly, we wanted to compare the electrochemical initiated coupling with the laccase catalysed coupling requiring oxygen, which is yielding much more side products.

In summary, slight acidic conditions with 1.75 mM acetic acid are favoured at 1:1 ratio of the substrates, because too acidic conditions reveal only the two-electron, two-proton oxidised coupling product and basic conditions receive a coupling product still at the beginning by air oxygen in the solution, where the reproducibility is not given. Only in 0.01% acetic acid in methanol the formation of byproducts is very low.

3.3. C-N coupling under different substrate ratios

To increase the yield of the coupling product higher amounts of the amine are necessary, as described by

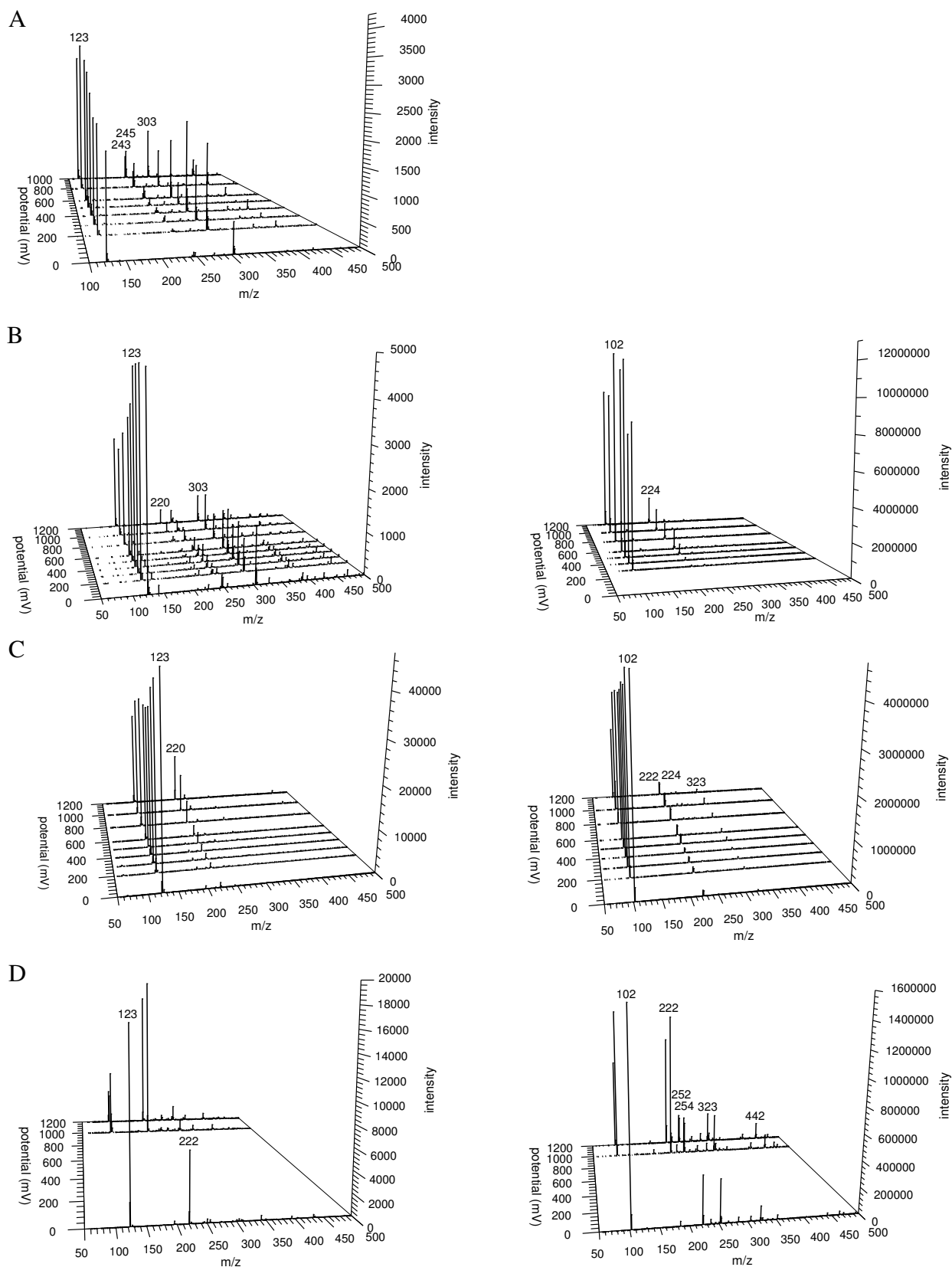


Fig. 2. A) Mass voltammogram of 1 mM 3-methylcatechol in 0.1% HOAc/MeOH in negative ESI mode. Mass voltammograms of 1 mM 3-methylcatechol + 1 mM *n*-hexylamin in B) 0.1% HOAc/MeOH, C) in 0.01% HOAc/MeOH and D) in MeOH in negative ESI mode on the left and positive ESI mode on the right.

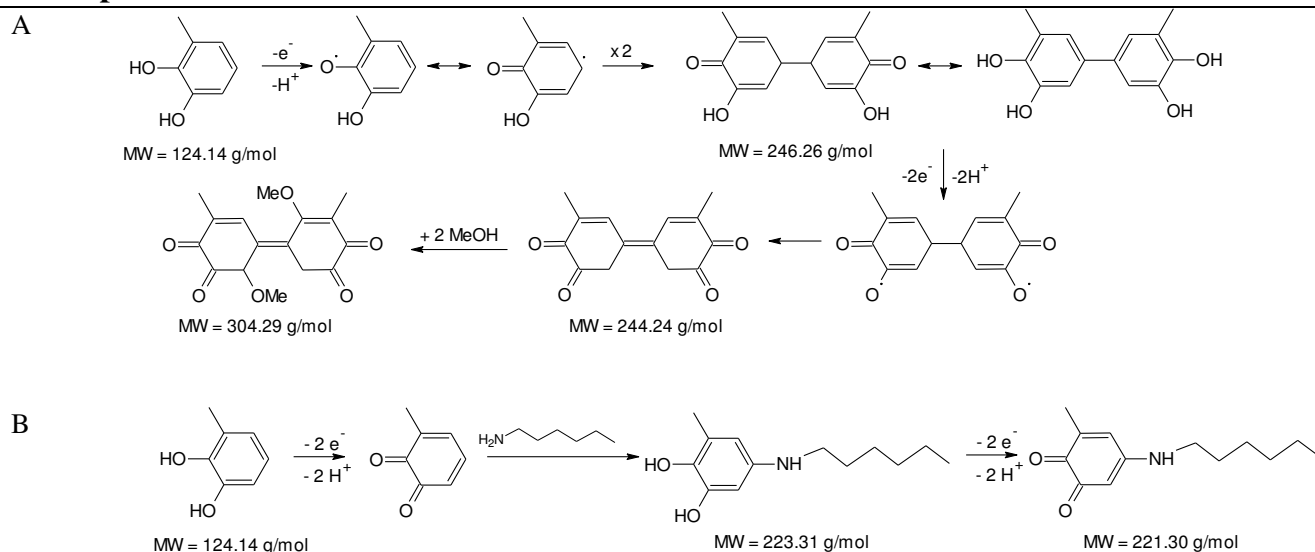


Fig. 3. Proposed oxidation mechanism of A) 3-methylcatechol and B) 3-methylcatechol + *n*-hexylamine.

Herter et al. They could increase the laccase-initiated coupling product up to 100% by using a ratio of 1:5 [11]. Mikolasch et al. transformed 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid with *n*-hexylamine into 3-(6-hexylamino-

3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid by laccase with a ratio of 1:6 and 60% conversion [17]. Hence, we tested a ratio of 1:2 with 0.01% acetic acid in methanol in our electrochemical initiated additions to increase the amount of the monoaminated coupling product. A CV experiment shows a higher limiting current (64 μ A; Fig. 1, red line), according to the ratio 1:1 (36 μ A; Fig. 1, green line). The increase in the intensity of the coupling product is displayed in relative description in Fig. 4. The inset in Fig. 4 describes the negative ESI mode and shows the increase of *m/z* 220 (solid line), while 3-methylcatechol (dashed line) decreases. The red colour stands for the ratio 1:2, whereas the green line represents the ratio 1:1. If the amine is in excess, 3-methylcatechol will be consumed up to 80% at 1.2 V. Only 20% remains and can be detected by the mass spectrometer. The intensity of the coupling product increases up to 93% yield. The ionisation efficiency in the ESI interface strongly depends on the properties of each compound; hence, a quantitative estimation including a complete mass balance cannot be fulfilled due to different ionisation behaviour of the species. In positive ESI mode both coupling products (*m/z* 222 and *m/z* 224) occur, but the four-electron, four-proton product is favoured.

To comprehend the Michael addition in detail, we also tested the ratio 2:1 with excess of 3-methylcatechol in the solution. The CV shows a decrease of the limiting current (27 μ A; Fig. 1, blue line) with respect to the ratio of 1:1. The poor coupling reaction is obtained in negative ESI mode with yields about 10%, and in positive ESI mode about 25% for the two-electron, two-proton product and 16% for the four-electron, four-proton product (blue solid lines in Fig. 4). The intensity for *n*-hexylamine hardly

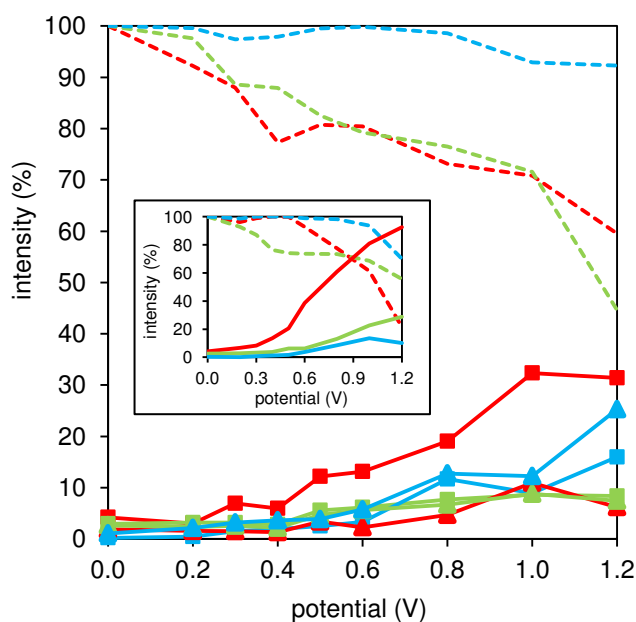


Fig. 4. Intensity for *n*-hexylamine (dashed line) and the products *m/z* 222 (squares) and *m/z* 224 (triangle) in 0.01% HOAc/MeOH as a function of applied potential for different ratios (red 1:2, green 1:1 and blue 2:1) in the positive ESI mode. Inset: Intensity of 3-methylcatechol (dashed line) and the product *m/z* 220 (solid line) in the negative ESI mode. The intensity of each ion was normalized to the maximum abundance at 0 V of *n*-hexylamine in the positive and 3-methylcatechol in the negative ESI mode, respectively.

changes with high applied potentials (blue dashed line). Moreover m/z 244 appears in negative ESI mode with 15% yield at 1.2 V, representing the oxidised catechol dimer. Hence, with 3-methylcatechol in excess the formation of byproducts increases.

3.4. Scale-up experiments

The electrochemical initiated heterocoupling reaction displays an alternative synthesis route to the enzymatic procedure, which needs high amounts of enzyme for the application in large-scale synthesis.

Higher substrate concentration coupling reactions were performed off-line in a two-step procedure. Controlled-potential coulometry at the potential of 0.8 V was carried out at a flow rate of about 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ to get a sufficient conversion. This corresponds to a theoretical residence time in the flow cell of approximately 5.6 s for the substrates. A compromise has to be done between high applied potential for full conversion (above 1.2 V) and an increasing corrosion-passivation process at the electrode

surface (starting at 0.6 V). In a second step the collected probe was diluted for mass spectrometric measurements by reaching a final concentration of 1 mM for 3-methylcatechol.

First, the two-step procedure was tested at the reaction of 1 mM 3-methylcatechol and 2 mM *n*-hexylamine in methanol with 0.01% HOAc, which represents 1.75 mM acid in the solution. Here, we assume slight basic conditions due to the excess of the amine with respect to acetic acid. The obtained mass spectra are shown in Fig. 5. In negative ESI mode the signal at m/z 123 decreases (39% conversion), while the signal at m/z 220 (four-electron, four-proton monoaminated oxidation product) increases (52% yield) at applied potential of 0.8 V. In positive ESI mode two product signals at m/z 222 (four-electron, four-proton monoaminated oxidation product, 42% yield) and m/z 323 (four-electron, four-proton diaminated oxidation product, 33% yield) appear. The amount of diaminated product in the two-step procedure is higher compared to the on-line EC/ESI-MS experiment (m/z 220 with 61% yield, m/z 222 with 19% yield and m/z 323 with 4% yield).

The next set of experiments focuses higher substrate concentrations. We investigated the coupling reaction of 10 mM 3-methylcatechol and 20 mM *n*-hexylamine in 0.1% acetic acid (17.5 mM) under slight basic conditions. Both, negative and positive ESI modes show a higher amount of byproducts. On top of that, in positive ESI mode the diaminated coupling product was obtained in higher yields (18% yield) than the monoaminated coupling product (12% yield). Hence, we increased the amount of acid to the same concentration of the amine to ensure neutral conditions in the reaction solution. Consequently, the main coupling product is the required four-electron, four-proton monoaminated oxidation product when employing 10 mM 3-methylcatechol and 20 mM *n*-hexylamine with 0.12% acetic acid (20 mM) in methanol.

Even higher substrate concentrations (50 mM 3-methylcatechol, 100 mM *n*-hexylamine with 0.6% acetic acid, which corresponds to 100 mM in methanol) cause inefficient conversion (m/z 220 with 21% yield, m/z 222 with 6% yield and m/z 323 with 3% yield), but reveal no multiple aminated coupling products in contrast to the laccase-initiated procedure [12]. Due to the diminished conversion we also tested 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate during the controlled-potential coulometry at 0.8 V. This corresponds to a theoretical residence time in the flow cell of approximately 16.9 s for the substrates. The amount of the required coupling product increased significantly in negative ESI mode (Fig. 5A, 50:100:100 low flow, m/z 220 with 28% yield), while in positive ESI

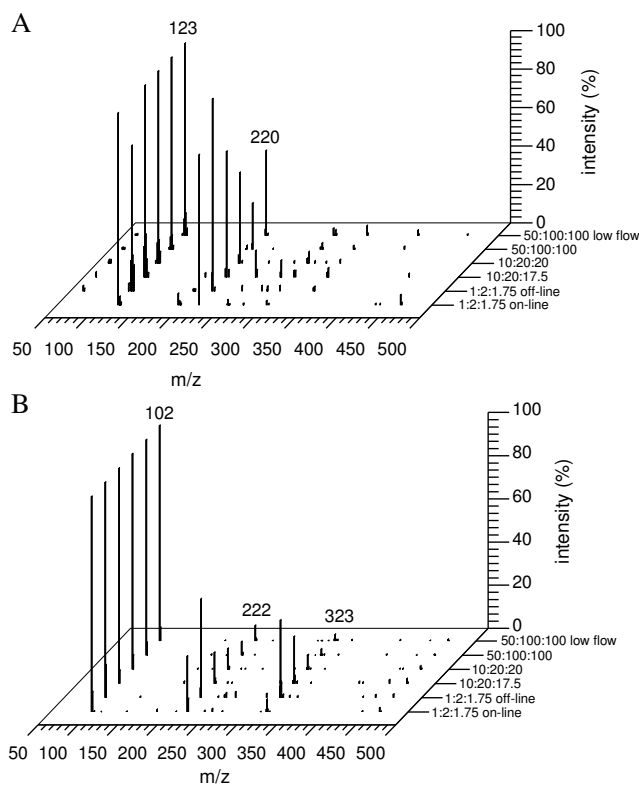


Fig. 5. Scale-up experiments of 3-methylcatechol:*n*-hexylamine:acetic acid in A) negative ESI mode and B) positive ESI mode in a two-step procedure (off-line controlled-potential coulometry at the potential of 0.8 V at a flow rate of 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, afterwards dilution of the collected probe for ESI-MS measurements).

mode the differences are negligible. Certainly, these first scale-up experiments will provide an overview of possible byproducts. Future experiments with high substrate concentrations should be investigated in a separate electrolysis cell.

4. Conclusion

Best results were obtained by using 3-methylcatechol and *n*-hexylamine in a ratio of 1:2. There, the number of byproducts is low and the conversion to the four-electron, four-proton product is moderate. Certainly, the excess of *n*-hexylamine may be higher in on-line experiments, but this may cause congestion in the mass spectrometer. Therefore, higher substrate concentration coupling reactions were performed off-line in a two-step procedure to get an idea of substrate concentration effects on the coupling reaction. In summary, the formation of the product is affected by factors such as the electrophilicity of the oxidised quinone, the nucleophilicity and the number of equivalents of the amine during the heterocoupling.

However, it has to be taken into account that under electrochemical conditions the reaction takes place at all oxidative labile sites in the molecule, whereas in enzyme-catalysed reactions the site of oxidation is sterically influenced by substrate-protein interactions. Although, we obtained no high-molecular-weight byproducts in contrast to Illner et al., who produced a lot of byproducts (compare Fig. SI-4 [12]). The electrochemical initiated C-N coupling showed only the diaminated product in small amounts.

As a result of all performed experiments, EC/ESI-MS is a suitable tool to support or even replace enzyme-catalysed reactions by electrochemical initiated reactions. The purely instrumental and time-saving method provides information about formed products on-line. In large-scale synthesis both synthetic routes are complex.

Furthermore, the combination of electrochemistry with on-line mass spectrometry has a great application potential for a wide variety of systems beyond the demonstrated example. We believe that numerous further applications are possible to substantiate enzyme-catalysed reactions, such as coupling reactions of *para*-hydroquinones with aromatic amines [18] or even a coupling with aryl and alkyl thiols to form C-S bonds [19].

5. Acknowledgements

Financial support by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF-Bundesministerium für Bildung und Forschung) (Grant Number 031A123) is gratefully acknowledged.

6. References

- [1] F. Pitterl, J.-P. Chervet, H. Oberacher, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 1203-1215.
- [2] N. A. Mautjana, D. W. Looi, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electrochimica Acta* **2009**, 55, 52-58.
- [3] N. A. Mautjana, J. Estes, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electroanalysis* **2008**, 20, 2501-2508.
- [4] D. W. Looi, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electrochimica Acta* **2011**, 56, 2633-2640.
- [5] N. A. Mautjana, J. Estes, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electroanalysis* **2008**, 20, 1959-1967.
- [6] N. A. Mautjana, D. W. Looi, J. R. Eyler, A. Brajter-Toth, *Electroanalysis* **2010**, 22, 79-89.
- [7] A. Baumann, U. Karst, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, 6, 715-731.
- [8] U. Jurva, H. V. Wikström, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 529-533.
- [9] T. Hoffmann, D. Hofmann, E. Klumpp, S. Küppers, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1859-1868.
- [10] S. Kummer, W. Ruth, U. Kragl, *Electroanalysis* **2015**, 27.
- [11] S. Herter, A. Mikolasch, D. Michalik, E. Hammer, F. Schauer, U. Bornscheuer, M. Schmidt, *Tetrahedron* **2011**, 67, 9311-9321.
- [12] S. Illner, R. Plagemann, P. Saling, U. Kragl, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, 102, 106-114.
- [13] D. Nematollahi, S. M. Golabi, *Electroanalysis* **2001**, 13, 1008-1015.
- [14] D. Nematollahi, S. Golabi, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1996**, 405, 133-140.
- [15] D. Smejkalova, A. Piccolo, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 1644-1649.
- [16] D. Smejkalova, A. Piccolo, M. Spiteller, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 6955-6962.
- [17] A. Mikolasch, E. Hammer, U. Jonas, K. Popowski, A. Stielow, F. Schauer, *Tetrahedron* **2002**, 58, 7589-7593.
- [18] T. H. Niedermeyer, A. Mikolasch, M. Lalk, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2002-2008.
- [19] K. W. Wellington, R. Bokako, N. Raseroka, P. Steenkamp, *Green Chemistry* **2012**, 14, 2567-2576.

7. Anhang

Im Folgenden werden ergänzende Informationen zu der Publikation II angeführt.

Supporting Information

Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS

Sina Kummer, Wolfgang Ruth, Udo Kragl

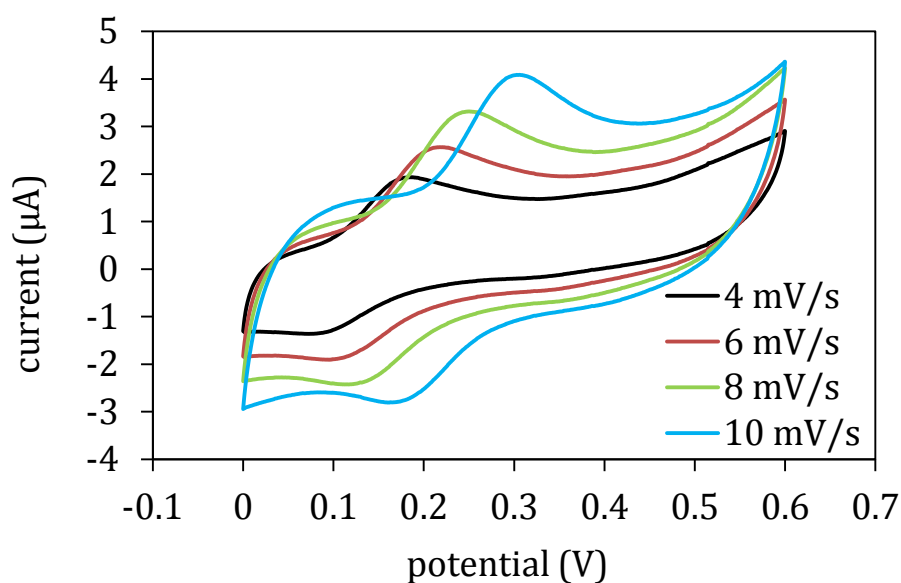


Figure S1. Static CV of 20 μM quercetin in 60% methanol and 40% water with 0.1% formic acid at different scan rates (4, 6, 8 and 10 mV/s).

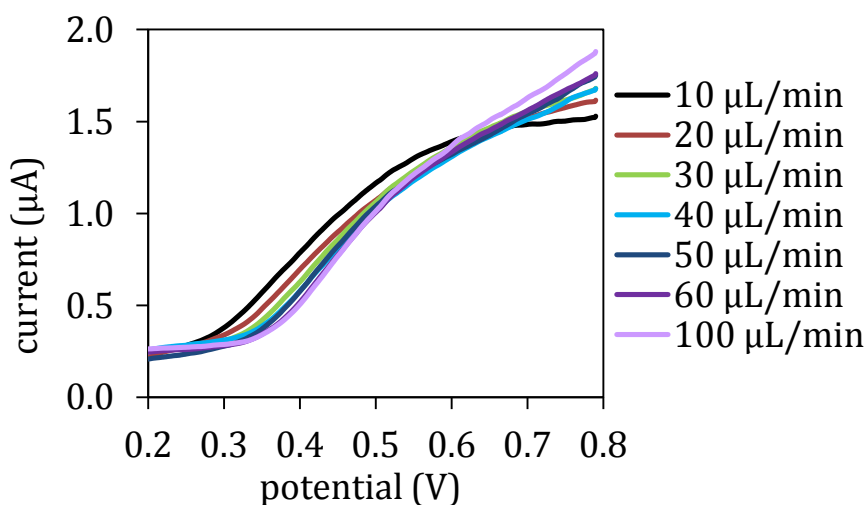


Figure S2. Hydrodynamic CV of 20 μM quercetin at 50 mV/s scan rate in 60% methanol and 40% water with 0.1% formic acid.

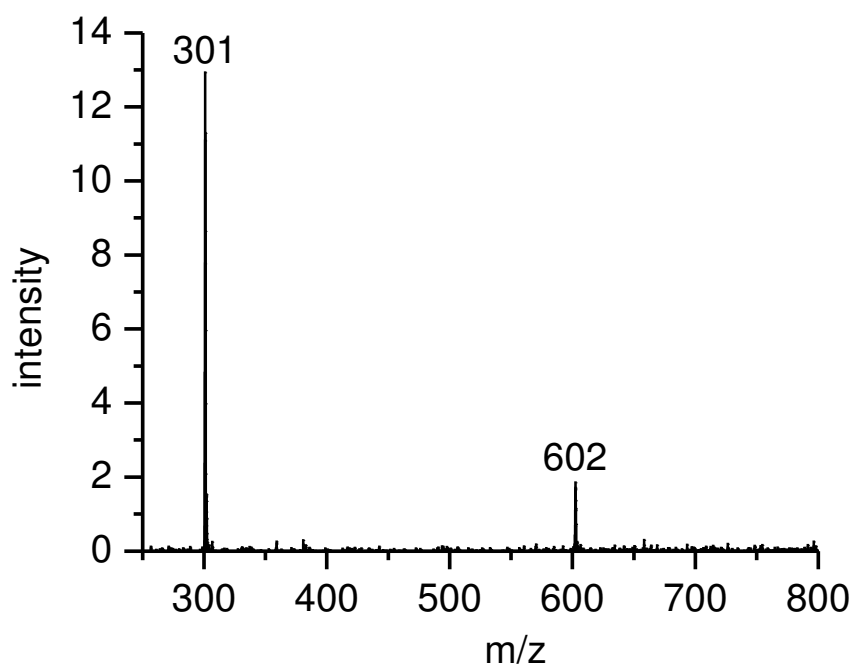


Figure S3. Mass spectra of 20 μM quercetin in 60% methanol and 40% water with 0.1% formic acid at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate in the negative ESI mode at a potential of 0 V. A signal at m/z 301 represents the molecular mass in the negative scan mode and at m/z 602 for the molecular adduct.

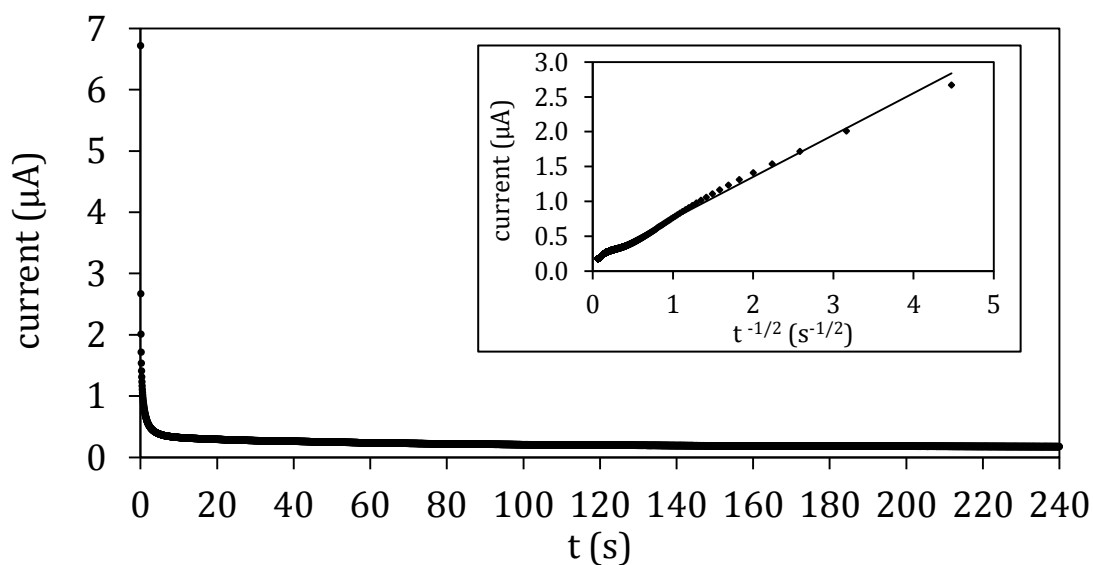


Figure S4. Chronoamperometry data analysis of the online EC-MS experiment of the electrolysis of 20 μM quercetin in methanol with 0.1% formic acid at a potential of 0.4 V at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$.

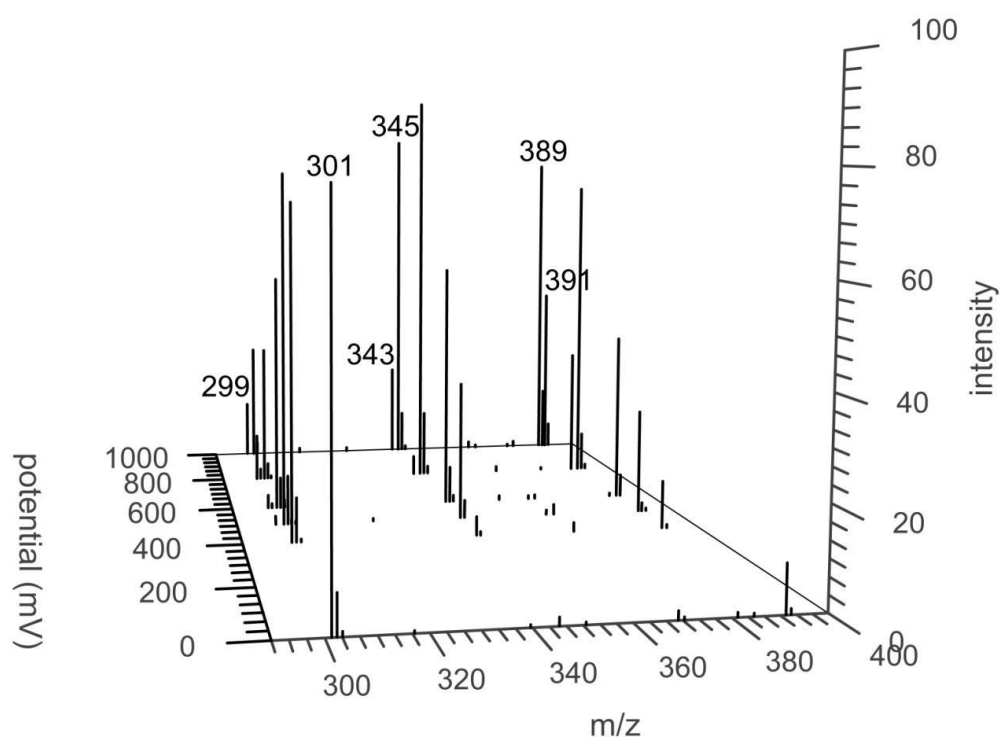


Figure S5. Mass voltammogram of 20 μM quercetin in ethanol with 0.1% formic acid at an 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate as a function of EC potential.

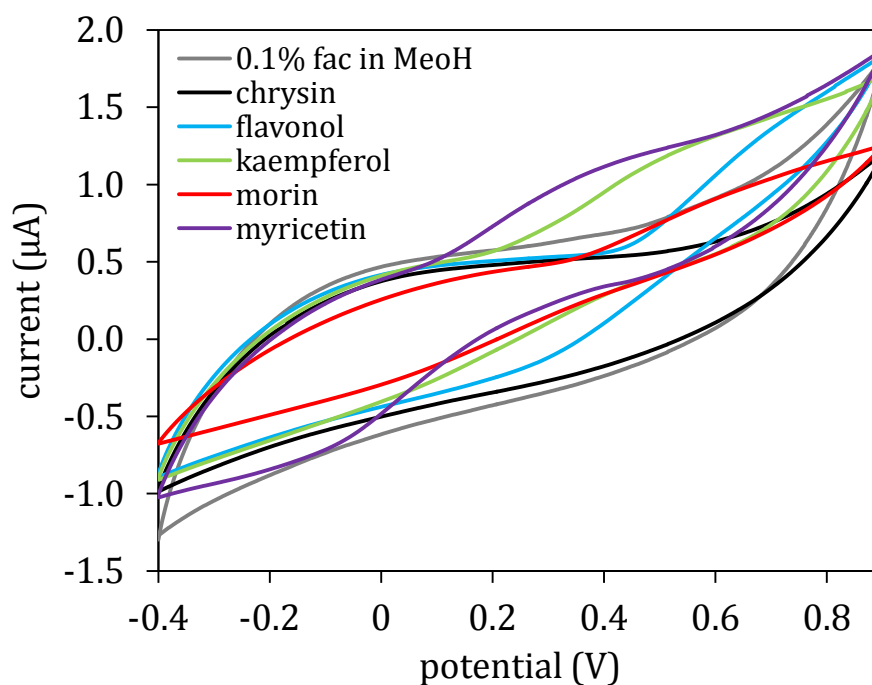


Figure S6. Static CV of 20 μM chrysin, flavonole, kaempferol, morin and myricetin in methanol with 0.1% formic acid at a scan rate of 4 mV/s , indicating the start potential of the proposed methoxylation reactions.

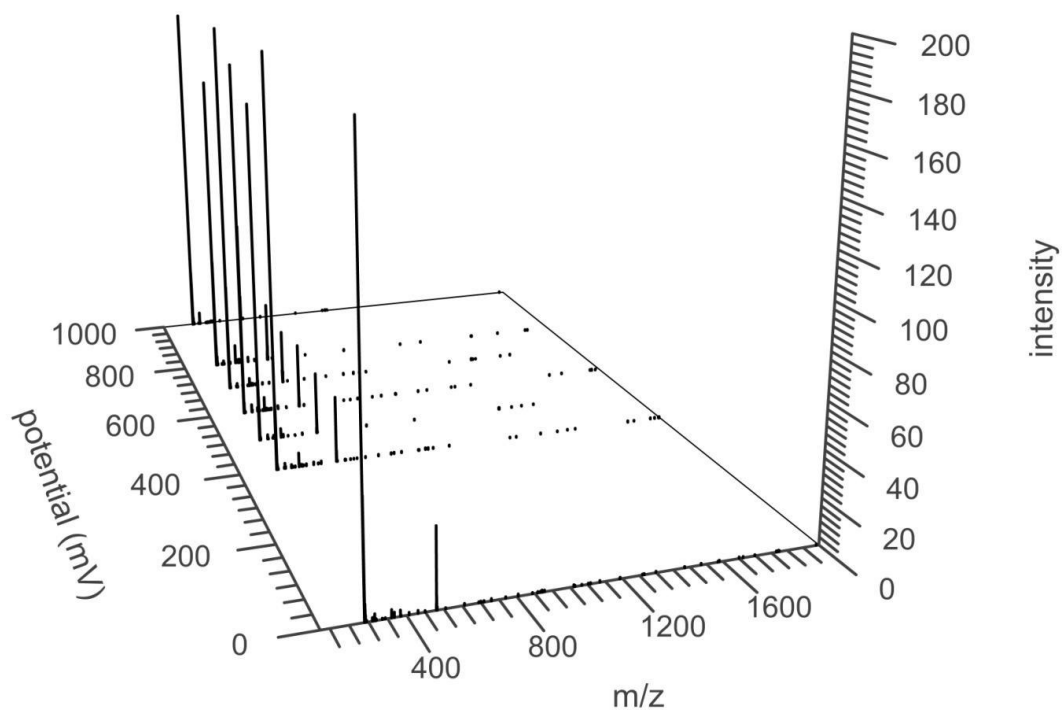


Figure S7. Mass voltammogram of 20 μM chrysin in methanol with 0.1% formic acid at a 12 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate as a function of EC potential.

Doktorandenerklärung

Doktoranden-Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Name: Sina Kummer

Anschrift: St.-Georg-Str. 63a, 18055 Rostock

Ich habe eine Dissertation zum Thema:

Elektrochemische Untersuchungen und Identifizierung von Oxidationsprodukten phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock angefertigt. Dabei wurde ich von Herrn Professor Dr. Udo Kragl betreut.

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegende Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen:

Comparison of Electrochemical Oxidation of Flavonols and Calculated Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water

Kummer, S.; Ruth, W.; Kühn, O.; Kragl, U.

Electroanalysis 26, 910-918 (2014)

DOI: 10.1002/elan.201300631

Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS

Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U.

Electroanalysis 27, in press

DOI: 10.1002/elan.201501055

Electrochemical Initiated C-N Coupling of 3-Methylcatechol and n-Hexylamine in a Flow Cell Monitored with ESI-MS

Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U.

Electroanalysis, in press

DOI: 10.1002/elan.201600035

Transfer of Ionic Liquids across the Water/1,2-Dichloroethane Interface

Kummer, S.; Klemmt, S.; Ruth, W.; Kragl, U.

Journal of Molecular Liquids, submitted

Probing Ion Transfer across Liquid-Liquid Interfaces by Monitoring Single Collisions of Attoliter Oil Droplets on Ultramicroelectrodes

Deng, H.; Dick, J.; Kummer, S.; Kragl, U.; Strauss, S.; Bard, A.

Analytical Chemistry, submitted

Poster:

Electrochemical Oxidation of Flavonols, Proton Affinity and Electron Transfer Enthalpy in Water

Kummer, S.; Ruth, W.; Kühn, O.; Kragl, U.

Electrochemistry 2014, 22.-24. September 2014, Mainz

Oxidation of Flavonols in an Electrochemical Flow Cell Coupled Online with ESI-MS

Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U.

GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2015, 30. August - 02. September 2015, Dresden

Transfer of Ionic Liquids across the Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions

Kummer, S.; Ruth, W.; Kragl, U.

Joint Annual EMLG/JMLG Meeting 2015, 06.-10. September 2015, Rostock.